EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores: P. Huber, Basel · R. Matthey, Lausanne · A. v. Muralt, Bern · L. Ruzicka, Zürich
Redactor: H. Mislin, Basel · Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL (SCHWEIZ)

SOMMAIRE – INHALT – SOMMARIO – CONTENTS

Articles généraux – Übersichtsreferate
Articoli riassuntivi – Surveys

R. Schindler: Fortschritte und Ergebnisse der Zellkulturmethodik 97

Brèves communications – Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni – Brief Reports

U. Renner und D. A. Prins: Voacanga-Alkaloide IV. Struktur von Voacryptin und Voacristin 106

Maud Chaput, G. Michel et E. Lederer: Sur le mycoside C_m, nouveau peptido-glycolipide isolé de *Myobacterium marianum* 107

W. Schlientz, R. Brunner, F. Thudium und A. Hofmann: Eine neue Isomerisierungsreaktion der Mutterkornalkaloide vom Peptidtypus. 49. Mitteilung über Mutterkornalkaloide 108

H. Lück und R. Kohn: Zur Bildung mittelkettiger Fettsäurereste in elektronenbestrahlten Fetten 109

E. E. Baulieu, R. Emiliozzi et C. Corpechot: Isolement dans le plasma veineux périphérique et surrénalien de l'ester-sulfate de 5-androstène 3β-ol 7,17 dione 110

G. D'Amico and A. Cesana: Studies on Cation Transport in Cold-Stored Human Erythrocytes. I. Effect of Aldosterone on Sodium and Potassium Transfer 111

G. D'Amico and A. Cesana: II. Effect of a Steroidal Antagonist of Aldosterone (SC 9420) on Sodium and Potassium Transfer . 112

Véra Slavíková and K. Slavík: On the Mechanism of Action of Some 4-Aminoanalogues of Folic Acid 113

Anna C. M. Pieck and Ch. M. A. Kuyper: Establishment of an Epithelial Cell Strain from Calf Liver in Continuous Culture 115

A. Marino: Physical Stress and Emetine Cardiotoxicity . . . 116

A. Marino: Psychological Stress and Emetine Cardiotoxicity . 117

H. C. Chopra: Autoradiographic Studies of Yolk Nucleus in Fish Oocytes 120

W. Scharloo: Temperature and Mutant Expression 121

Amanda Pellegrino de Iraldi and E. De Robertis: Action of Reserpine on the Submicroscopic Morphology of the Pineal Gland 122

A. M. Goodeve and E. Ramstad: Tryptophan, Precursor of Tropic Acid in *Datura Stramonium* 124

Sat Parkash Sharma: Histochemical Observations on the Pigment Bodies of the Spinal Neurones of some Reptiles . . . 125

Barbara Gillespie and Kenneth V. Thimann: The Lateral Transport of Indoleacetic Acid-C^{14} in Geotropism 126

Z. Budesinsky und V. Bydzovsky: Über neue chemotherapeutisch wirksame Sulfonamide 129

Z. Valenta, A. Khaleque, and M. H. Rashid: *cis*-Cyclohexane-1,2-Diol in the Beaver Gland 130

E. Flückiger and R. Salzmann: Effect of Iproniazid on Pregnancy 130

E. Flückiger und R. Salzmann: Serotoninantagonismus an der Placenta 131

E. C. Dougherty, B. Solberg, and D. Joanne Ferral: The First Axenic Cultivation of a Rotifer Species. (Pro Experimentis) 131

J. M. Long and R. Guillemin: On the *in vitro* Bioassay for Measuring Melanophoretic Activity (Pro Experimentis) 132

J. Gallera et G. Nicolet: Quelques commentaires sur les méthodes de culture *in vitro* de jeunes blastodermes de poulet (Pro Laboratorio) 134

A. G. E. Pearse and R. Hess: Substantivity and other Factors Responsible for Formazan Patterns in Dehydrogenase Histochemistry (Studiorum Progressus) 136

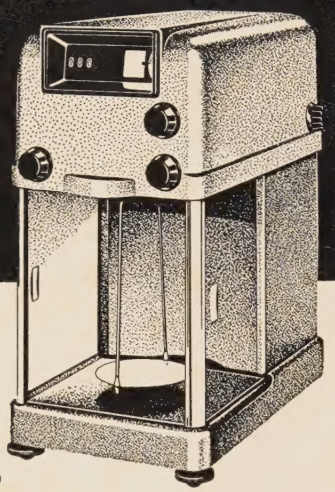
K. Brecht und P. Pauschinger: Die Beeinflussbarkeit der Tiegelschen Kontraktur durch Änderungen der extracellulären Calciumkonzentration (Studiorum Progressus) 141

Fonds für den Ruzicka-Preis 1961 144

Corrigenda 144

Mettler

Analysenwaagen Typ H 200 mg optische Skala



H15 Makro
H16 Halbmikro

Unser Ziel ist, laufend neue Instrumente zu entwickeln, die den steigenden Anforderungen in Forschung und Industrie jederzeit entsprechen, die einfach konzipiert und damit betriebssicher sind.
E. Mettler, Pelikanstrasse 19, Zürich

Liste des annonceurs – Verzeichnis der Inserenten – Elenco degli inserzionisti – List of Advertisers – Experientia XVII/3

Bios Laboratories, Inc., New York
CIBA Aktiengesellschaft, Basel
Euratom, Bruxelles
Ganz Optar AG, Zürich
J. R. Geigy AG, Basel
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel
Lonza AG, Basel
E. Mettler, Zürich
Philips AG, Zürich
Sandoz AG, Basel

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an frs. 74.–. Ce prix s'entend en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt Fr. 74.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può essere richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 74.–. Il prezzo è inteso in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription is sFr. 74.–. Price in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

© *1961 Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Telephon (061) 23 18 10; Telegrammadresse: Edita Basel*

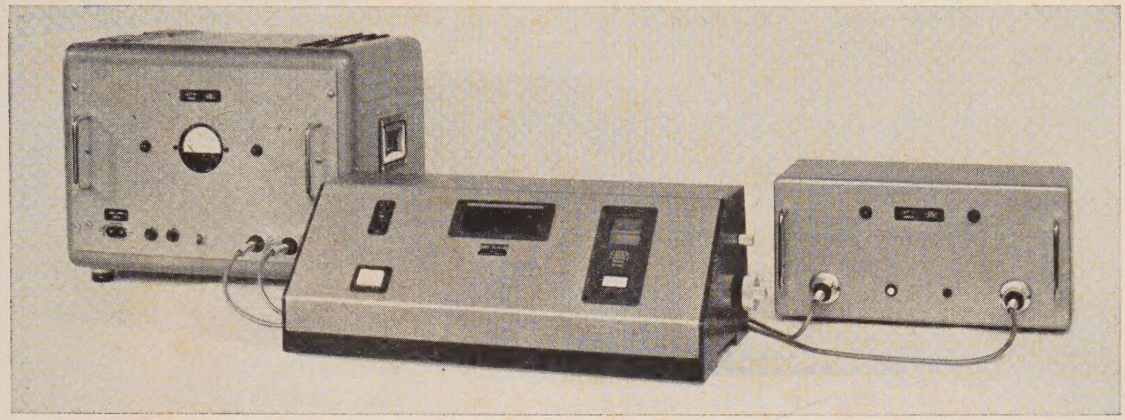
Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

ZEISS

Lichtelektrisches Präzisionspolarimeter 0,005°

Besondere Merkmale:

- Hohe Meßgenauigkeit
- Frei von persönlichen Einstellfehlern und frei von Parallaxe
- Ermüdungsfreie Reihenmessung und denkbar einfache Bedienung
- Automatische Empfindlichkeitsregelung



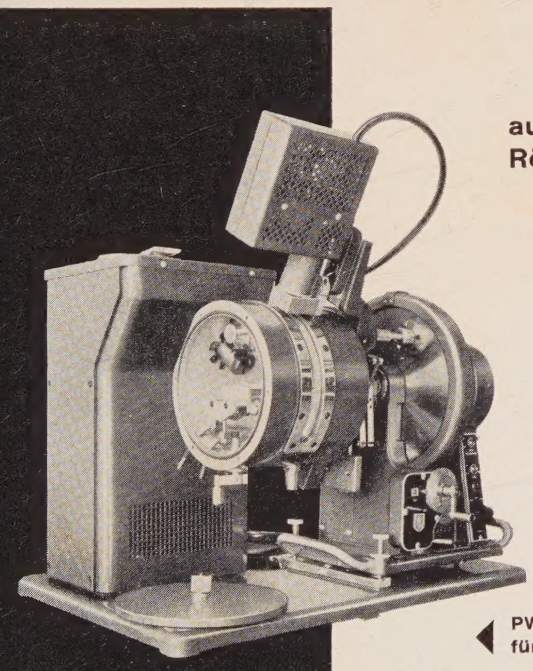
Bitte verlangen Sie den Prospekt Nr. 50–381/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS

Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ *Optar* AG
ZÜRICH
Bahnhofstr. 40 Tel. (051) 25 16 75



Spektralanalyse

auch der leichten Elemente (Na) mit Röntgen-Vakuumspektrograph und Diskriminator

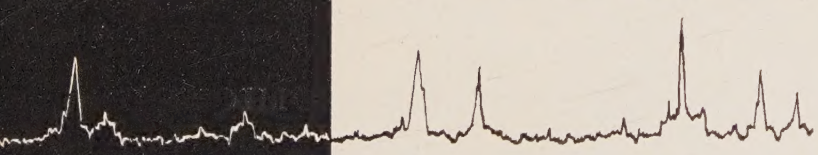
Die modernste, erprobte Philips-Apparatur arbeitet

- **einfacher**
- **rascher**
- **exakter**
- **empfindlicher**
- **sicherer**
- **zerstörungsfrei**

Neues aus unserem Lieferprogramm:

- **Vakuumspektrograph mit Spezial-Röntgenröhre hoher Dosisleistung und mit höchstem Auflösungsvermögen.**
- **Einelement-Goniometer für Routineanalysen**
- **Feinfokusröhren für Diffraktion**

PW 1540, Vakuum-Spektrograph robuster Bauart für Forschungs- und Routinearbeit



PHILIPS

Alles für Diffraktion und Analyse lieferbar durch

Philips AG Zürich, Abt. Industrie, Binzstr. 38
Telephon 051/25 86 10 und 27 04 91

EURATOM

EUROPEAN ATOMIC ENERGY COMMUNITY

A frequent obstacle to the use of labelled complex molecules is the difficulty involved in purchasing them or obtaining them by way of exchange. Furthermore, the user sometimes finds that he has either to make them himself or to arrange for them to be synthesized elsewhere, which is a long and expensive procedure.

These difficulties could be minimized, and even partly eliminated, by building up a collection of rare labelled organic compounds which would remain permanently at the disposal of users. This scheme would obviously apply only to products labelled by means of either long-lived or stable isotopes.

The Commission of the European Atomic Energy Community (Euratom) is planning to set up a collection of this sort and, for this purpose, calls on any public or private body having laboratories which synthesize or which have synthesized, for their own use, labelled molecules that have not yet been put on the market. The Commission would like to discuss with such bodies the possibility of stepping up their production.

As the Commission is fully aware of the storage difficulties involved, the scheme would include only those products which do not require at the time of use a more laborious purification process than that entailed in their manufacture.

Permanent or temporary orders will be placed for the products selected. Provision would likewise be made for research contracts for study of preparation, purification and conservation methods.

Interested bodies should write to the following address:

COMMUNAUTÉ EUROPÉENNE DE L'ÉNERGIE ATOMIQUE (Euratom)

Direction Générale Recherches et Enseignement (Molécules marquées)

51-53, rue Belliard, Brussels, Belgium

Neuentwicklungen auf dem Gebiete
der organischen Zwischenprodukte

Wir liefern technische Versuchsmengen von:

Cyanessigsäure
Cyanessigsäuremethylester · Cyanessigsäureäthylester
Cyanacetamid

Malonsäure
Malonsäuredimethylester · Malonsäurediäthylester
Barbitursäure

Acrylsäure
Methyl- und Aethylacrylat

Orthoameisensäureester

Dehydracetsäure

4-Methyluracil

LONZA AG., BASEL

Am Anfang jedes chemischen Produktes steht die Forschung, und zwar

gezielte Forschung

Zufallstreffer sind selten geworden. Ein gut aufeinander abgestimmtes Räderwerk, in dem jeder Forscher Teilaufgaben löst, die näher und näher zum Ziel führen, bis eines Tages der Wurf gelingt, ist heute der einzig gangbare Weg. In den Geigy-Laboratorien führen Hunderte von qualifizierten Mitarbeitern jährlich Zehntausende von Versuchen durch. Dieser hohe Einsatz in gezielter Forschung bürgt dafür, daß Geigy auch in Zukunft bei Verbrauchern in der ganzen Welt auf Vertrauen zählen darf.

Geigy

J.R. Geigy A.G., Basel

A 7

EXPERIENTIA

Vol. XVII – Fasc. 3 Pag. 97–144 15. III. 1961

Fortschritte und Ergebnisse der Zellkulturmethodik

Von R. SCHINDLER*

Die Methode der Züchtung von Warmblütlerzellen *in vitro* ist heute beinahe 50 Jahre alt: 1912 konnte CARREL zeigen, dass es bei Verwendung einer geeigneten Nährlösung und deren regelmässiger Erneuerung möglich ist, Kulturen von Bindegewebe aus Hühnerembryonen beliebig lange im Zustand aktiver Proliferation und Zellvermehrung zu erhalten[1]. Die von CARREL benützte Technik ist während nahezu 40 Jahren ziemlich unverändert beibehalten worden. Erst um das Jahr 1950 ist es dann, vor allem dank den Anstrengungen von EARLES Arbeitsgruppe, gelungen, die experimentellen Möglichkeiten so weit zu vervollkommnen, dass die bisher vorwiegend qualitativen Methoden der Zellkultur auch für quantitative Untersuchungen Verwendung finden konnten. Damit hat nun in den letzten 10 Jahren eine eindrucksvolle Entwicklung auf diesem Gebiet eingesetzt, sowohl in der Erweiterung der methodischen Grundlagen als auch in deren Anwendung auf eine ganze Reihe von Disziplinen der Medizin und Biologie, wie der Biochemie, Pharmakologie, Virologie, Genetik und Radiobiologie, welche zusammen mit den gegenwärtigen Entwicklungen und Bestrebungen den Gegenstand dieser Übersicht bilden soll.

Bereits CARRELS Arbeiten haben gezeigt, dass bei fortgesetzter Kultur *in vitro* der für den Gesamtorganismus typische Charakter der Gewebe und Organe als organisierte Zellverbände verloren geht und dass die Zelle unter diesen Bedingungen gewissermassen zum selbständigen Mikroorganismus mit unbeschränkter exponentieller Zellvermehrung ohne Alterserscheinungen wird[2]. Wie MURRAY in ihrer schönen Übersicht im vorletzten Jahrgang dieser Zeitschrift[3] dargestellt hat, haben jedoch auch die relativ kurzfristigen Kulturen von differenzierten Geweben ihre grosse Bedeutung für das Verständnis und die Analyse der Wechselwirkungen zwischen gleich- und verschiedenartigen Zellen. Das vorliegende Referat soll sich indessen beschränken auf die eigentlichen Zellkulturen, in welchen im allgemeinen eine zeitlich unbegrenzte exponentielle Zellvermehrung und eine möglichst einheitliche Zellpopulation angestrebt wird, und welche dadurch in hervorragender Weise für das Studium der Zelle als eines biologischen Individuums geeignet sind. Im weiteren soll sich diese Übersicht auf Kulturen von Säugetierzellen (bzw. Warmblüterzellen) beschränken; denn obschon auch die Kultur von pflanzlichen Zellen und Geweben sehr eingehend bearbeitet worden ist, haben sich die beiden Methoden weitgehend unabhängig voneinander entwickelt. Zellkulturen von niederen Tieren und Insekten haben anderseits naturgemäss geringeres Interesse gefunden als solche von Warmblütern. Schliesslich ist zu sagen, dass dieses kurze Referat keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben kann, in Ergänzung zur kürzlichen Besprechung einzelner Aspekte durch MOSER[4] jedoch eine möglichst umfassende Übersicht besonders auch für Leser ohne eigene Erfahrung auf diesem Gebiet geben möchte. Für ausführliche Darstellungen sei im übrigen auf die Monographie von PAUL[5] und die Literaturübersicht von MURRAY[6] verwiesen.

CARREL[1] stellte seine Kulturen durch Einbettung eines kleinen Gewebsstückes in ein Gel aus Blutplasma und Embryoextrakt her. Darüber wurde als Nährlösung eine Mischung von Serum, Embryoextrakt und physiologischer Salzlösung gegeben und in regelmässigen Zeitabständen erneuert. Aus dem Gewebsstück wanderten dann Zellen in das umgebende Gel aus, und die Kultur konnte nach einiger Zeit durch Einbettung eines Teils des durch Zellenvermehrung und -auswanderung grösser gewordenen Gewebsstückes in ein neues Plasma-Gel überpflanzt werden. Die Nachteile solcher Kulturen liegen auf der Hand und sind auch bereits von EARLES Gruppe formuliert worden[7]: die Herstellung des Plasma-Gels ist technisch schwierig; dazu wird häufig das Gel trübe oder verflüssigt sich im Laufe der Inkubation; die quantitative Erfassung des Wachstums der Kultur sowie die Unterscheidung zwischen

* Pharmakologisches Institut der Universität Bern.

1 A. CARREL, J. exp. Med. *15*, 516 (1912).

2 A. H. EBELING, J. exp. Med. *35*, 755 (1922).

3 M. R. MURRAY, Exper. *15*, 289 (1959).

4 H. MOSER, Exper. *16*, 385 (1960).

5 J. PAUL, *Cell and Tissue Culture* (E. and S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London 1959).

6 M. R. MURRAY und G. KOPECH, *A Bibliography of the Research in Tissue Culture* (Academic Press, New York 1953).

7 V. J. EVANS und W. R. EARLE, J. nat. Cancer Inst. *8*, 103 (1947).

Zellvermehrung und Zellwanderung ist nur bedingt möglich; ausserdem können die Zellen von dem halbfesten Kulturmedium nicht abgetrennt werden, und da dieses Kulturmedium chemisch völlig undefiniert ist, ist die Brauchbarkeit der Kulturen für biochemische und pharmakologische Versuche ausserordentlich eingeschränkt. Anderseits ist anzuerkennen, dass diese Methodik für viele wertvolle morphologische Arbeiten Verwendung gefunden hat, und dass auf diese Weise eine ganze Anzahl von Zellstämmen gezüchtet worden ist, welche sich seither in vielen Untersuchungen als nützlich erwiesen haben und auch heute noch in sehr vielen Laboratorien verwendet werden: so EARLES L-stamm[8], hervorgegangen aus Bindegewebe der Maus, und der HeLa-Zellstamm, entstanden aus einem menschlichen Cervical-Carcinom[9–11].

Die Grundlage für die Ausarbeitung quantitativer Methoden ist mit der Einführung flüssiger Kulturmedien durch EARLE gelegt worden. Zuerst gelang es, mit Hilfe einer Cellophan-Matrix Kulturen herzustellen, in welchen sich die Zellen am Cellophan und an der Glasoberfläche des Kulturgefässes ausbreiteten und sich dabei in direktem Kontakt mit der flüssigen Nährlösung befanden[7]. Bald darauf zeigte es sich dann, dass bei Verwendung von Suspensionen von Einzelzellen als Inoculum keine Cellophanmatrix nötig ist[12]. Auf diese Weise entstanden die sogenannten «Monolayer»-Kulturen, in welchen sämtliche Zellen, überdeckt von der Nährlösung, an der Glasoberfläche des Kulturgefässes haften und sich durch Vermehrung auf der verfügbaren Fläche bis zur Bildung einer zusammenhängenden Zellschicht ausbreiten. Die Herstellung von Zellsuspensionen aus solchen Kulturen für die Übertragung in neue Kulturgefässe geschah zuerst durch mechanisches Ablösen, doch wurde dafür bald die Verwendung von Trypsin eingeführt, welches sich auch bei der Herstellung von Zellsuspensionen aus Geweben und Organen für Primärkulturen sehr gut bewährt hat [13,14].

Eine weitere methodische Vereinfachung ergab sich durch die Entwicklung von Suspensionskulturen. Solche kommen dadurch zustande, dass das Kulturmedium entweder durch Rotation der Kulturgläser [15,16] oder durch eine Rühreinrichtung [17–20] dauernd in Bewegung gehalten wird. Daneben sind einige Zellstämme beschrieben worden, deren Zellen selbst in stationären Kulturen nicht an der Glasoberfläche festhaften[21–24]. Suspensionskulturen bieten die Möglichkeit, die Zellvermehrung durch Entnahme von Proben aus ein und derselben Kultur laufend zu verfolgen, und ausserdem lässt sich bei der Übertragung in neue Kulturgefässe die Verwendung von Trypsin mit der damit verbundenen Zellschädigung vermeiden. Schliesslich ist die Entwicklung von Vorrichtungen zu nennen, welche die Kultur von Säugetierzellen unter «steady state»-Bedingungen ermöglichen. Dies ist beispielsweise dadurch erreicht worden, dass sich die Kultur als Zellsuspension innerhalb eines porösen Gefässes befindet, welches mit frischer Nährlösung durchströmt wird[25,26]. Dabei können recht hohe Zelldichten erhalten werden, jedoch ist die Dauer der Kultur nicht unbeschränkt, da die Zelldichte ständig ansteigt. Ein anderes Prinzip beruht darauf, dass zur Kultur kontinuierlich frische Nährlösung zufliesst, so dass die Zellvermehrung durch die dauernde Verdünnung eben kompensiert wird; durch regelmässige Entnahmen von Proben der Zellsuspensionen oder durch einen Überlauf wird ausserdem das Volumen der Kultur konstant gehalten. Auf diese Weise werden besonders günstige Kulturbedingungen und dadurch eine sehr rasche Zellvermehrung, mit Generationszeiten von nur 10 bis 12 h erreicht[27,28].

Die Verwendung flüssiger Kulturmedien und die damit verbundene Möglichkeit der Herstellung homogener Zellsuspensionen hat rasch zum Ausbau von Methoden zur quantitativen Bestimmung der Zellvermehrung geführt. Mittels Zellsuspensionen ist es ohne weiteres möglich, für vergleichende Versuche beliebig viele Kulturen mit identischem Inoculum anzusetzen[29]. Die Zellvermehrung kann bei Suspensionskulturen besonders einfach gemessen werden durch Auszählen der Zellen in einer der für Leukocytenzählungen gebräuchlichen Zählkammern.

Für «Monolayer»-Kulturen kommt eine entsprechende Zählung der mit Hilfe von Zitronensäure in Suspension gebrachten Zellkerne[30] oder die Zählung der Zellen nach Behandlung mit Trypsin in Frage. Daneben ist eine ganze Reihe einfacher chemischer Be-

[8] W. R. EARLE, J. nat. Cancer Inst. *4*, 165 (1943).
[9] G. O. GEY, W. D. COFFMAN und M. T. KUBICEK, Cancer Res. *12*, 264 (1952).
[10] W. F. SCHERER, J. T. SYVERTON und G. O. GEY, J. exp. Med. *97*, 695 (1953).
[11] G. O. GEY, F. B. BANG und M. K. GEY, Ann. N.Y. Acad. Sci. *58*, 976 (1954).
[12] J. E. SHANNON und W. R. EARLE, J. nat. Cancer Inst. *12*, 155 (1951).
[13] R. DULBECCO, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. *38*, 747 (1952).
[14] J. S. YOUNGNER, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *85*, 202 (1954).
[15] W. R. EARLE, E. L. SHILLING, J. C. BRYANT und V. J. EVANS, J. nat. Cancer Inst. *14*, 1159 (1954).
[16] A. F. GRAHAM und L. SIMINOVITCH, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N.Y. *89*, 326 (1955).
[17] W. R. EARLE, J. C. BRYANT und E. L. SHILLING, Ann. N. Y. Acad. Sci. *58*, 1000 (1954).
[18] W. R. EARLE, J. C. BRYANT, E. L. SHILLING und V. J. EVANS, Ann. N. Y. Acad. Sci. *63*, 666 (1956).
[19] W. F. MCLIMANS, E. V. DAVIS, F. L. GLOVER und G. W. RAKE, J. Immunol. *79*, 428 (1957).
[20] B. S. DANES, Exp. Cell Res. *12*, 169 (1957).
[21] G. A. FISCHER, Proc. Amer. Ass. Cancer Res. *2*, 201 (1957).
[22] G. A. FISCHER, Proc. N. Y. Acad. Sci. *76*, 673 (1958).
[23] R. C. PARKER, L. N. CASTOR und E. A. MCCULLOCH, N. Y. Acad. Sci. spec. Publ. *5*, 303 (1957).
[24] R. SCHINDLER, M. DAY und G. A. FISCHER, Cancer Res. *19*, 47 (1959).
[25] K. G. MCCARTHY, Proc. Amer. Ass. Cancer Res. *2*, 230 (1957).
[26] S. GRAFF und K. S. MCCARTHY, Exp. Cell Res. *13*, 348 (1957).
[27] E. P. COHEN und H. EAGLE, Fed. Proc. *19*, 385 (1960).
[28] R. SCHINDLER, Helv. physiol. Acta *18*, C 60 (1960).
[29] V. J. EVANS, W. R. EARLE, K. K. SANFORD, J. E. SHANNON und H. K. WALTZ, J. nat. Cancer Inst. *11*, 907 (1951).
[30] K. K. SANFORD, W. R. EARLE, V. J. EVANS, H. K. WALTZ und J. E. SHANNON, J. nat. Cancer Inst. *11*, 773 (1951).

stimmungsmethoden beschrieben worden, vor allem für Zellprotein[31], für Desoxyribonukleinsäure (DNS)[32,33] für DNS-Phosphor[34] und für Zell-Purine und -Pyrimidine[35]. In all diesen Fällen besteht eine befriedigende Proportionalität zwischen Zellzahl und Gehalt einer Kultur an diesen Zellkomponenten; für Kulturen in verschiedenen Wachstumsphasen ist diese Proportionalität allerdings nicht mehr streng erfüllt[36,37]. Schliesslich ergibt sich eine Möglichkeit zur quantitativen Erfassung ausschliesslich der vermehrungsfähigen Zellen dadurch, dass nach entsprechender Verdünnung einer Zellsuspension die Zahl der Kolonien bestimmt wird, welche sich aus den einzelnen, am Glas haftenden Zellen entwickeln. Diese Methode ist wohl die zuverlässigste, was die Unterscheidung zwischen «lebenden» und «toten» Zellen anbetrifft, und besonders wertvoll für die Analyse kurzfristiger cytotoxischer Effekte wie zum Beispiel der Röntgenstrahlen.

Die Züchtung von reinen Zellstämmen, das heisst von Zellpopulationen, welche von einer einzelnen Zelle abstammen, ist nun im Gegensatz zu der bakteriologischen Methodik bei Säugerzellkulturen nicht ohne weiteres möglich, indem isolierte Zellen ohne Anwendung besonderer Kunstgriffe im allgemeinen nicht zur Vermehrung befähigt sind. Der Grund für dieses Verhalten scheint darin zu liegen, dass Säugerzellen gewisse Metabolite in das umgebende Milieu abgeben und dadurch an diesen Stoffwechselprodukten verarmen, falls das Volumen des Kulturmediums im Vergleich zum Zellvolumen unverhältnismässig gross ist. Damit wird es verständlich, dass eine kritische minimale Populationsdichte eine Voraussetzung für eine fortgesetzte Zellvermehrung bildet[38]. Es besteht hier offenbar ein wesentlicher Unterschied zu den meisten Mikroorganismen, deren Zellmembranen eine bedeutend geringere Permeabilität beziehungsweise eine viel ausgeprägtere Befähigung zu aktiven Transportleistungen aufweisen dürften.

Eine erste Möglichkeit zur Züchtung isolierter Zellen ergab sich durch deren Kultur innerhalb einer Glaskapillare, wodurch das Volumen des umgebenden Mediums hinreichend klein gehalten wird[39]. Eine neuere, von Puck entwickelte Methode besteht in der Verwendung eines sogenannten «feeder layer», das heisst einer Monolayer-Kultur von Zellen, welche durch Röntgenbestrahlung ihrer Vermehrungsfähigkeit beraubt, in ihren Stoffwechselfunktionen aber noch mehr oder weniger intakt geblieben sind[40]. Solche bestrahlte «feeder layers» vermögen nun die benötigten Metaboliten an das Nährmedium abzugeben, so dass in diesem Milieu isolierte Zellen mit sehr guter Ausbeute zu Kolonien auswachsen. Pucks Gruppe konnte fernerhin zeigen, dass unter Umständen auf die Verwendung des «feeder layer» verzichtet werden kann: dazu ist eine besonders milde Trypsin-Behandlung bei der Herstellung der Zellsuspension erforderlich, und ein weiterer Kunstgriff besteht im Zusatz von Agar zur Nährlösung; dadurch wird die Konvektion des Mediums verhindert und damit der Verlust von Metaboliten aus den Zellen herabgesetzt[41]. Bei einzelnen Zellstämmen konnten so aus 100% der Einzelzellen Kolonien erhalten werden. Die Kolonieausbeute hängt jedoch ausserdem sehr von der Zusammensetzung der verwendeten Nährlösung ab[42,43], was nicht verwunderlich ist, da ja ein Kulturmedium, in welchem die betreffenden, aus den Zellen austretenden Metabolite bereits vorhanden sind, einer Verarmung der Zellen an diesen Substanzen entgegenwirken muss. Auf die Natur dieser Stoffe wird bei der Besprechung der Nährbedürfnisse von Zellkulturen noch näher eingegangen werden.

Ein wertvoller methodischer Fortschritt ist durch die Technik der Aufbewahrung von Zellstämmen im tiefgefrorenen Zustand geschaffen worden. Da sich Zellstämme bei fortgesetzter Kultur *in vitro* häufig langsam in ihren Charakteristiken verändern – das gleiche gilt übrigens auch bei fortgesetzter Transplantierung von Tumoren *in vivo* –, ist es wünschbar, auf eingefrorene Zellpopulationen zurückgreifen zu können, welche einer solchen allmählich stattfindenden Veränderung ihrer Eigenschaften nicht ausgesetzt sind. Es hat sich gezeigt, dass zwei Kunstgriffe für ein erfolgreiches Einfrieren wesentlich sind: einerseits der Zusatz von 10 bis 15% Glycerin zur Zellsuspension und anderseits ein sehr langsames Senken der Temperatur im Bereich von 0° bis −25° C. Auf diese Weise ist es gelungen, von 82 untersuchten Zellstämmen jeden einzelnen während ein bis zwei Jahren ohne Verlust der spezifischen Eigenschaften in gefrorenem Zustand lebensfähig zu erhalten[44].

Schliesslich ist als bedeutende Neuerung der Zusatz von Antibiotica zu den Nährlösungen[45,46] zu erwähnen.

[31] V. J. Oyama und H. Eagle, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *91*, 305 (1956).
[32] J. Paul, J. biophys. biochem. Cytol. *2*, 797 (1956).
[33] F. C. McIntire, und M. F. Sproull, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *95*, 458 (1957).
[34] G. M. Healy, D. C. Fisher und R. C. Parker, Can. J. Biochem. Physiol. *32*, 319 (1954).
[35] F. C. McIntire und M. S. Smith, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *98*, 76 (1958).
[36] N. P. Salzman, Biochim. biophys. Acta *31*, 158 (1959).
[37] M. N. Swaffield und G. E. Foley, Arch. Biochem. Biophys. *86*, 219 (1960).
[38] W. R. Earle, K. K. Sanford, V. J. Evans, H. K. Waltz und J. E. Shannon, J. nat. Cancer Inst. *12*, 133 (1951).
[39] K. K. Sanford, W. R. Earle und G. D. Likely, J. nat. Cancer Inst. *9*, 229 (1948).
[40] T. T. Puck und P. I. Marcus, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. *41*, 432 (1955).
[41] T. T. Puck, P. I. Marcus und S. J. Cieciura, J. exp. Med. *103*, 273 (1956).
[42] T. T. Puck und H. W. Fisher, J. exp. Med. *104*, 427 (1956).
[43] P. I. Marcus, S. J. Cieciura und T. T. Puck, J. exp. Med. *104*, 615 (1956).
[44] T. S. Hauschka, J. T. Mitchell und D. J. Niederpruem, Cancer Res. *19*, 643 (1959).
[45] J. F. Enders, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *82*, 100 (1953).
[46] J. F. Metzger, M. H. Fusillo, J. Cornman und D. M. Kulms, Exp. Cell Res. *6*, 337 (1954).

Dadurch ist die Gefahr und Häufigkeit mikrobieller Infektionen in den Kulturen ausserordentlich herabgesetzt worden, was die komplizierten, streng aseptischen Vorkehrungen und Laboreinrichtungen früherer Zeiten überflüssig gemacht hat.

Die Einführung flüssiger Nährmedien und quantitativer Methoden zur Bestimmung der Zellvermehrung hat die Grundlage geschaffen für Versuche, die aus Serum und Embryoextrakt bestehenden Nährlösungen durch chemisch definierte zu ersetzen und damit die Nährbedürfnisse der Zellkulturen abzuklären. Es zeigte sich auf Grund von Dialyse-Versuchen, dass nur der niedermolekulare Anteil von Embryoextrakt, anderseits bei Zusatz einer synthetischen Mischung von Wuchsstoffen[47] nur der hochmolekulare Anteil von Serum für das Wachstum der Kulturen notwendig ist[48,49]. EAGLE hat daraufhin eine Nährlösung entwickelt, welche, abgesehen von einer geringen Menge von dialysiertem Serum, chemisch definiert ist, und es ist sein Verdienst, für jede einzelne niedermolekulare Komponente deren Unentbehrlichkeit für die Zellververmehrung nachgewiesen zu haben[50].

Überraschend war dabei der Befund, dass eine ganze Anzahl verschiedener Zellstämme qualitativ übereinstimmende Nährbedürfnisse aufweist. Diese sind in der Tabelle zusammengestellt und sollen hier kurz diskutiert werden. Bei den anorganischen Komponenten fällt auf, dass ein Bedürfnis für Eisen und andere Spurenelemente bisher nicht aufgezeigt werden konnte; offenbar sind diese Metallionen so fest an die Serumproteine gebunden, dass sie bei der Dialyse nicht entfernt werden. Von den Aminosäuren sind nicht nur diejenigen, welche für den Gesamtorganismus als essentiell erkannt worden sind[60], für die Ernährung von Zellkulturen unentbehrlich, sondern es kommen 5 weitere dazu, nämlich Arginin, Cystin, Glutamin, Histidin und Tyrosin. Die Gründe für diese Diskrepanz sind bisher nicht geklärt, man kann sich jedoch vorstellen, dass im Ganztier eine Synthese dieser Substanzen zum Beispiel nur in der Leber stattfindet. Bei den Vitaminen konnten bisher Biotin, Vitamin B_{12} sowie die fettlöslichen Vitamine nicht als essentiell nachgewiesen werden. Dies dürfte ebenfalls darauf zurückzuführen sein, dass diese Vitamine so fest an die Serumproteine gebunden sind, dass sie durch die Dialyse nicht vollständig entfernt werden. Als energielieferndes Kohlehydrat dient im allgemeinen Glukose, welche aber auch durch Mannose, Galaktose, Fruktose und teilweise durch andere Kohlehydrate und deren Abbauprodukte ersetzt werden kann[59]. Überhaupt sind in mehreren Fällen die aufgeführten Wuchsstoffe durch nahe verwandte Substanzen ersetzbar, wie etwa Pyridoxal durch Pyridoxin oder Pyridoxamin.[61]

Die Funktion des dialysierten Serums im Nährmedium ist heute noch nicht vollständig geklärt. Einerseits dient es mit Sicherheit als Träger für gewisse weitere, an die Serumproteine gebundene Wuchsstoffe. Dafür spricht unter anderem die Beobachtung, dass Zellkulturen in einem proteinfreien, chemisch definierten Medium gezüchtet werden können, falls dieses Medium über eine Dialysemembran in Kontakt mit einer Lösung steht, welche ihrerseits dialysiertes Serum sowie ein proteolytisches Fermentpräparat enthält[62]. Anderseits konnte jedoch bisher mit Ausnahme weniger Zellstämme das dialysierte Serum durch noch so reichhaltige Mischungen niedermolekularer Wuchsstoffe nicht ersetzt werden[63]. Fraktionierung der Serumproteine hat zu zwei aktiven Fraktionen geführt: einerseits das Albumin, welches vermutlich auf Grund adsorbierter Wuchsstoffe seine Wirkung ausübt und welches in neueren Versuchen durch Katalase, Insulin und Versen teilweise ersetzt werden konnte[64]; anderseits ein α-Globulin, dessen augenfälligste Wirkung darin beruht, dass es die Zellen veranlasst, sich an der Glasoberfläche auszubreiten und daran festzuhaften, und dessen Konzentration in fötalem Serum besonders hoch ist[65]. Ob es auch für die Zellvermehrung in Sus-

Allgemeine Nährbedürfnisse von Säuger-Zellkulturen

a) *Anorganische Stoffe*[51–53]

$Na^{\cdot}$	Cl'
$K^{\cdot}$	H_2PO_4'
$Mg^{\cdot\cdot}$	HCO_3'
$Ca^{\cdot\cdot}$	

b) *Aminosäuren*[54,55]

Isoleucin	Arginin
Leucin	Cystin
Lysin	Glutamin
Methionin	Histidin
Phenylalanin	Tyrosin
Threonin	
Tryptophan	
Valin	

c) *Vitamine*[56–58]

Cholin
Folsäure
Inosit
Nicotinamid
Pantothensäure
Pyridoxal
Riboflavin
Thiamin

d) *Kohlehydrat*[59]

Glukose

e) *Dialysiertes Serum*

[47] J. F. MORGAN, N. J. MORTON und R. C. PARKER, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *73*, 1 (1950).
[48] K. K. SANFORD, H. K. WALTZ, J. E. SHANNON, W. R. EARLE und V. J. EVANS, J. nat. Cancer Inst. *13*, 121 (1952).
[49] K. K. SANFORD, P. A. LEADBETTER, J. C. BRYANT, W. P. BRAKER, V. J. EVANS und W. R. EARLE, J. nat. Cancer Inst. *14*, 513 (1953).
[50] H. EAGLE, Science *122*, 501 (1955).
[51] H. EAGLE, Arch. Biochem. Biophys. *61*, 356 (1956).
[52] R. P. GEYER und R. S. CHANG, Arch. Biochem. Biophys. *73*, 500 (1958).
[53] H. E. SWIM und R. F. PARKER, J. biophys. biochem. Cytol. *4*, 525 (1958).
[54] H. EAGLE, J. exp. Med. *102*, 37 (1955).
[55] H. EAGLE, J. biol. Chem. *214*, 839 (1955).
[56] H. EAGLE, J. exp. Med. *102*, 595 (1955).
[57] H. EAGLE, V. I. OYAMA, M. LEVY und A. E. FREEMAN, Science *123*, 845 (1956).
[58] H. EAGLE, V. I. OYAMA, M. LEVY und A. E. FREEMAN, J. biol. Chem. *226*, 191 (1957).
[59] H. EAGLE, S. BARBAN, M. LEVY und H. O. SCHULZE, J. biol. Chem. *233*, 551 (1958).
[60] W. C. ROSE, R. L. WIXOM, H. B. LOCKHART und G. F. LAMBERT, J. biol. Chem. *127*, 987 (1955).
[61] H. EAGLE, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N.Y. *91*, 358 (1956).
[62] H. EAGLE, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. *46*, 427 (1960).
[63] G. M. HEALY, D. C. FISHER und R. C. PARKER, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *89*, 71 (1955).
[64] I. LIEBERMAN und P. OVE, J. biol. Chem. *234*, 2754 (1959).
[65] H. W. FISHER, T. T. PUCK und G. SATO, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. *44*, 4 (1958).

pensionskulturen unentbehrlich ist, kann angesichts von sich widersprechenden Befunden wohl noch nicht definitiv entschieden werden. Reinigung dieses Faktors hat zur Auffassung geführt, dass es sich sehr wahrscheinlich um ein Glycoproteid handelt[66,67].

Wohl das erstaunlichste Ergebnis aus all diesen Untersuchungen ist der Befund, dass die Nährbedürfnisse einer grossen Zahl verschiedener Zellstämme, herstammend von verschiedenen Species und sowohl normalen wie neoplastischen Ursprungs, im wesentlichen übereinstimmen[58]. Damit ist auch die Hoffnung, auf dieser Basis einen Unterschied zwischen normalen Zellen und Krebszellen zu finden, enttäuscht worden. Es ergibt sich hier somit eine völlig andere Situation als bei den Mikroorganismen, welche bekanntlich in ihren Wuchsstoffbedürfnissen in weitem Rahmen variieren, und wo oft noch innerhalb einer Species eine ganze Fülle von Mutanten bekannt geworden sind.

Anderseits sind nun doch für einige Zellstämme auch gewisse spezielle Wuchsstoffbedürfnisse beschrieben worden. Bei diesen zusätzlichen Wuchsstoffen handelt es sich um die Aminosäuren Asparagin, Serin und Glykokoll. Ferner zeigen einige Zellstämme einen stark erhöhten Bedarf für Folsäure. Diese speziellen Nährbedürfnisse treten bei den verschiedenen Zellstämmen zum Teil einzeln, zum Teil in Kombination auf[24,68–71].

Eine spezielle Frage stellen die Nährbedürfnisse isolierter Zellen dar; diese sind, wie bereits ausgeführt, grösser als diejenigen dichterer Zellpopulationen. Ob ein Nährmedium diesen weitergehenden Bedürfnissen genügt, lässt sich daran erkennen, ob eine gute Kolonieausbeute («cloning efficiency)» erreicht wird, das heisst, ob ein hoher Prozentsatz der isolierten Zellen zu Kolonien auswächst. Bei Verwendung von dialysiertem Serum in der Nährlösung wurden so eine ganze Reihe zusätzlicher Nutrienten als unentbehrlich für die Vermehrung isolierter Zellen erkannt: einmal weitere Aminosäuren (zusätzlich zu den 13 in der Tabelle aufgeführten), so vor allem Serin[4,72], ferner Metaboliten des Zitronensäure-Zyklus, wie Pyruvat, Oxalacetat oder α-Ketoglutarat[4,73], und ausserdem auch Cholesterin[74]. Weiterhin haben sich Purine als wachstumsstimulierend für isolierte Zellen des Walker-Carcinoms erwiesen[75].

Schliesslich ist noch zu erwähnen, dass es in mehreren Fällen gelungen ist, Säuger-Zellstämme an ein chemisch definiertes Nährmedium (ohne Zusatz von Serum) zu adaptieren[76–80]. In diesen Fällen liegen allerdings gute Anhaltspunkte dafür vor, dass dabei eine intensive Selektion stattgefunden hat, und ausserdem ist bemerkenswert, dass die Zellvermehrung in solchen synthetischen Nährmedien meist wesentlich langsamer vor sich geht als bei Zusatz von Serum.

Im folgenden sollen nun einige besonders interessante Anwendungen der Zellkulturen und deren Ergebnisse besprochen werden.

Biochemie. Untersuchungen mit markierten Aminosäuren haben gezeigt, dass die Zellproteine nicht stabil sind, sondern in recht intensivem Austausch mit den freien Aminosäuren im Zellinnern (dem sogenannten Aminosäure-«Pool») stehen: selbst wenn keine Nettosynthese von Protein vor sich geht, findet ein ständiger Einbau von Aminosäuren statt in einem Ausmass, welches einer Neubildung von etwa 1% des Zellproteins/h entspricht[81]. Hinsichtlich der Nukleinsäuren liegen ähnliche Untersuchungen vor. Die Stabilität von mit P^{32} wie auch mit Formiat-C^{14} markierten Nukleinsäuren ist untersucht worden[82–84]. Für die Desoxyribonukleinsäure ist dabei eine bemerkenswerte, wenn auch offenbar nicht absolute Stabilität gefunden worden, indem deren spezifische Aktivität praktisch nur nach Massgabe der Zellvermehrung abnimmt. Im Gegensatz dazu ist die Ribonukleinsäure wesentlich weniger stabil, so dass hier die Verhältnisse den für die Proteine beschriebenen näher kommen.

Eine andere Anwendungsmöglichkeit für die Biochemie besteht in der Abklärung der biochemischen Funktionen von Vitaminen. So kann zum Beispiel Pyridoxal aus der Nährlösung weggelassen werden, wenn zusätzlich zu den 13 essentiellen Aminosäuren (Tabelle) weitere 8 «nichtessentielle» Aminosäuren in das Medium einbezogen werden[85]. Offenbar dient also unter diesen Bedingungen Pyridoxal nach Umwandlung in Pyridoxalphosphat ausschliesslich als Coenzym für Transaminierungen. Ähnlich kann Folsäure durch die Kombination von Glykokoll, Thymidin und einem Purin ersetzt werden[86], so dass wir annehmen können, dass Folsäure hier nach Umwandlung in Coenzym F

66 I. Lieberman und P. Ove, J. biol. Chem. *233*, 637 (1958).
67 I. Lieberman, und P. Ove, Biochim. biophys. Acta *25*, 449 (1957).
68 R. E. Neumann und T. A. McCoy, Science *124*, 124 (1956).
69 T. A. McCoy, M. Maxwell und R. E. Neumann, Cancer Res. *16*, 979 (1956).
70 G. A. Fischer und A. D. Welch, Science *126*, 1018 (1957).
71 T. A. McCoy, M. Maxwell und P. F. Kruse, Cancer Res. *19*, 591 (1959).
72 R. Z. Lockart und H. Eagle, Science *129*, 252 (1959).
73 R. E. Neumann und T. A. McCoy, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *98*, 303 (1958).
74 G. Sato, H. W. Fisher und T. T. Puck, Science *126*, 961 (1957).
75 R. E. Neumann, und A. A. Tytell, Exp. Cell Res. *15*, 637 (1958).
76 V. J. Evans, J. C. Bryant, W. T. McQuilkin, M. G. Fioramonti, K. K. Sanford, B. B. Westfall und W. R. Earle, Cancer Res. *16*, 87 (1956).
77 W. T. McQuilkin, V. J. Evans und W. R. Earle, J. nat. Cancer Inst. *19*, 885 (1957).
78 V. J. Evans, J. nat. Cancer Inst. *19*, 539 (1957).
79 R. W. Pumper, Science *128*, 363 (1958).
80 C. Waymouth, J. nat. Cancer Inst. *22*, 1003 (1959).
81 H. Eagle, Science *130*, 432 (1959).
82 G. M. Healy, L. Siminovitch, R. C. Parker und A. F. Graham, Biochim. biophys. Acta *20*, 425 (1956).
83 A. F. Graham und L. Siminovitch, Biochim. biophys. Acta *26*, 427 (1957).
84 R. Y. Thomson, J. Paul und J. N. Davidson, Biochem. J. *69*, 553 (1958).
85 R. F. Haff und H. E. Swim, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N.Y. *94*, 779 (1957).
86 M. T. Hakala, Science *126*, 255 (1957).

einzig den Einbau von Ein-Kohlenstoff-Fragmenten in die Purine und in Thymin sowie die Umwandlung Serin-Glykokoll katalysiert.

Schliesslich ist die Verwendung von Zellstämmen mit spezifischen biochemischen Funktionen zu erwähnen. So konnte an Kulturen eines Mäuse-Mastocytoms gezeigt werden, dass Serotonin ausschliesslich aus freiem Tryptophan gebildet wird. Weiterhin ermöglichte die Züchtung einer hinsichtlich dieser Synthese besonders leistungsfähigen Zellinie, die Umwandlung von Tryptophan in Serotonin auch in zellfreien Homogenaten nachzuweisen[87].

Pharmakologie. Zellkulturen stellen naturgemäss ein sehr ansprechendes Modellsystem für maligne Tumoren dar, und so sind sie auch ausgiebig für das Studium der Wirkung von krebshemmenden Stoffen verwendet worden. Sehr überraschend war dabei der Befund, dass Kulturen von normalen Zellen und von Krebszellen praktisch die gleiche Empfindlichkeit gegenüber Carcinostatica aufweisen[88,89]. Eine befriedigende Erklärung dafür konnte bis jetzt nicht gegeben werden; zudem ist es schwer, abzuschätzen, ob *in vitro* eine geringere Empfindlichkeit der Krebszellen oder eine erhöhte Empfindlichkeit normaler Zellen vorliegt. Es wurde auch die Ansicht geäussert, dass sich normale Zellen in der Kultur mit der Zeit in Zellen mit neoplastischen Eigenschaften umwandeln; anderseits liess sich jedoch zeigen, dass Kulturen normaler Zellen bereits in der ersten Generation *in vitro* sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Carcinostatica von Krebszellkulturen nicht mehr unterscheiden[90].

Eine vieldiskutierte Frage ist die der Eignung von Zellkulturen als Testobjekt für die Prüfung neuer potentieller Carcinostatica[91]. Dies ist von grosser praktischer Bedeutung, da die Prüfung solcher Substanzen an transplantierbaren Tumoren einen ausserordentlich grossen zeitlichen und finanziellen Aufwand mit sich bringt. Im allgemeinen hat es sich gezeigt, dass Substanzen mit carcinostatischer Wirkung *in vivo* auch an Zellkulturen eine hohe Toxizität aufweisen[88,89,92]. Jedoch besteht keinerlei quantitative Korrelation zwischen carcinostatischer Wirkung *in vivo* und Toxizität *in vitro*, mit Ausnahme eng begrenzter Stoffgruppen wie zum Beispiel der Folsäureantagonisten[88]. Da immerhin die meisten krebshemmenden Stoffe eine recht hohe Toxizität an Zellkulturen aufweisen, ist nun argumentiert worden, dass man Zellkulturen für eine erste Prüfung («Primary screen») von neuen Substanzen verwenden könnte, um dann diejenigen mit guter Hemmwirkung *in vitro* einer weiteren Prüfung an transplantierbaren Tumoren *in vivo* zu unterziehen. Dabei stellt sich allerdings die Frage, ob es auch Carcinostatica gibt, welche eine geringe oder gar keine Hemmwirkung auf Zellkulturen ausüben und welche dann durch eine solche vorläufige Prüfung nicht erfasst würden. In der Tat sind nun mehrere solche Stoffe bekannt geworden; als Beispiele seien 6-Azauracil[93] als Vertreter der Antimetaboliten und Endoxan[94] als Beispiel eines Radiomimeticums erwähnt. Zusammenfassend kann somit wohl gesagt werden, dass Zellkulturen für eine Prüfung potentieller Carcinostatica von zweifelhaftem Wert sind, und tatsächlich wird die routinemässige Testung neuer Verbindungen immer noch sehr weitgehend an transplantierbaren Tumoren *in vivo* durchgeführt.

Anderseits sind nun aber Zellkulturen mit sehr gutem Erfolg zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von krebshemmenden Stoffen herangezogen worden. Eine wichtige Möglichkeit für solche Studien besteht in der Analyse von Antagonismen zwischen Antimetaboliten und normalen Stoffwechselsubstanzen. Damit lassen sich oft sehr wertvolle Erkenntnisse über den biochemischen Angriffspunkt eines Hemmstoffes gewinnen. So wird zum Beispiel die Hemmwirkung von 6-Azauridin durch Uridin[93], diejenige von 5-Fluorcuracil-desoxyribosid durch Thymidin[95] aufgehoben. Die Hemmung durch 6-Mercaptopurin wird durch Hypoxanthin in kompetitiver Weise, durch Adenin dagegen in nicht kompetitiver Weise rückgängig gemacht, was darauf hindeutet, dass 6-Mercaptopurin die Umwandlung von Hypoxanthin in Adenin blockiert[96]. Ein weiteres interessantes Beispiel ist die Aufhebung der Wirkung des Folsäure-Antagonisten Amethopterin durch die Kombination von Thymidin, Glykokoll und einem Purin[86,97]. Die Zugabe dieser drei Metaboliten, deren Synthese in der Zelle mit Hilfe von Coenzym F vor sich geht, macht den durch Amethopterin induzierten Mangel an Coenzym F wirkungslos.

Schliesslich sind diejenigen Fälle von besonderem Interesse, in welchen eine Substanz *in vivo* eine carcinostatische Wirkung ausübt, auf Zellkulturen dagegen keinerlei Hemmeffekt zeigt. Ein solcher Sachverhalt lässt im allgemeinen darauf schliessen, dass die Verbindung zwar selber unwirksam ist, jedoch *in vivo*, zum Beispiel in der Leber, in ein Produkt mit carcinostatischer Wirkung umgewandelt wird. Dies konnte für 6-Azauracil gezeigt werden; diese Verbindung ist *in vitro* unwirksam, wird aber *in vivo* teilweise in 6-Azauracil-Ribosid verwandelt, welches für die krebshemmende Wirkung verantwortlich ist und auch an Zellkulturen eine beträchtliche Toxizität aufweist[93,98].

[87] R. SCHINDLER, Biochem. Pharmacol. *1*, 223 (1958).
[88] H. EAGLE und G. E. FOLEY, Amer. J. Med. *21*, 739 (1956).
[89] H. EAGLE und G. E. FOLEY, Cancer Res. *18*, 1017 (1958).
[90] G. E. FOLEY und H. EAGLE, Cancer Res. *18*, 1012 (1958).
[91] E. HIRSCHBERG, Cancer Res. *18*, 869 (1958).
[92] E. HIRSCHBERG, A. GELLHORN, M. R. MURRAY und E. F. ELSLAGER, J. nat. Cancer Inst. *22*, 567 (1959).
[93] R. SCHINDLER und A. D. WELCH, Science *125*, 548 (1957).
[94] G. E. FOLEY, O. M. FRIEDMAN und B. P. DROLET, Proc. Amer. Ass. Cancer Res. *3*, 111 (1960).
[95] M. A. RICH, J. L. BOLAFFI, J. E. KNOLL, L. CHEONG und M. L. EIDINOFF, Cancer Res. *18*, 730 (1958).
[96] M. T. HAKALA und C. A. NICHOL, J. biol. Chem. *234*, 3224 (1959).
[97] M. T. HAKALA, J. biol. Chem. *234*, 126 (1959).
[98] R. SCHINDLER und A. D. WELCH, Biochem. Pharmacol. *1*, 132 (1958).

Virologie. Die Fortschritte in der Kultur von Säugerzellen haben auf die Virusforschung ausserordentlich befruchtend eingewirkt, und heute bildet die Zellkulturmethodik vielleicht deren wichtigste experimentelle Grundlage und ist aus virologischen Laboratorien kaum mehr wegzudenken. Die hervorragende Eignung von Zellkulturen für virologische Untersuchungen wurde allgemein erkannt, als es gelang, das Poliomyelitis-Virus in Kulturen von extraneuralem Gewebe zu züchten[99]. Als besonders geeignetes Substrat für dieses Virus haben sich darauf Kulturen von Affennierenzellen erwiesen, in welchen eine bis 10fache Zunahme des Virustiters erreicht wird[100]. Dies eröffnete gegenüber dem Tierversuch ganz neue Möglichkeiten für das Studium der Virusproduktion und zur Gewinnung von Virusmaterial in grösseren Mengen und hat schliesslich unter anderem zu der von SALK entwickelten Poliomyelitis-Vaccine geführt. Ein wesentlicher Schritt in der Richtung auf quantitative Methoden wurde geleistet, als es gelang, an Monolayer-Kulturen die Viruspartikel sozusagen zu zählen, indem jedes einzelne Virus, in einer genügend verdünnten Lösung auf die Kultur gebracht, zu einer makroskopisch sichtbaren Zone abgestorbener Zellen, einer sogenannten «Plaque», führt[13,100]. Da die Viren innerhalb einer Plaque alle von einem einzelnen Viruspartikel abstammen, ist es auf diese Weise zudem möglich, genetisch einheitliche Virusstämme zu züchten.

Mit Hilfe von Zellkulturen ist unter anderem auch der Frage nach den Wuchsstoffbedürfnissen für die Virussynthese nachgegangen worden, und es hat sich gezeigt, dass diese weniger umfangreich sind als diejenigen für die Zellvermehrung. So genügen im allgemeinen die üblichen Mineralien, Glukose und Glutamin[101], während in sehr verdünnten Zellpopulationen noch die übrigen, neben Glutamin für die Zellen essentiellen Aminosäuren sowie Serumalbumin dazukommen[102]. Ähnlich wie im Falle des Tabakmosaikvirus konnte auch für das Poliovirus nachgewiesen werden, dass die Virus-Ribonukleinsäure nach Abtrennung des Virusproteins unter entsprechenden Bedingungen ihre Infektivität beibehält[103]. Der Proteinanteil scheint neben der Ausübung einer Schutzfunktion vor allem für die Wirtsspezifität des Virus verantwortlich zu sein, indem die freie Virus-Ribonukleinsäure imstande ist, auch in solche Zellen einzudringen und darin die Virussynthese auszulösen, welche gegenüber dem Gesamtvirus resistent sind[104,105].

Viele Untersuchungen haben sich auch mit den im Zusammenhang mit der Virusinfektion und -synthese in der Zelle ablaufenden biochemischen Vorgängen befasst. Sowohl die morphologischen wie die biochemischen Effekte hängen dabei sehr von der Art des Virus ab: Poliovirus zum Beispiel bewirkt viel tiefergreifende Veränderungen als etwa Herpes- oder Influenza-Virus[106]. Wohl die ausführlichsten Untersuchungen liegen heute über die Wirkungen der Poliovirus-Infektion auf Zellkulturen vor. Was die frühen Veränderungen im Stoffwechsel der Proteine, Ribonukleinsäure und Desoxyribonukleinsäure nach Infektion mit diesem Virus anbetrifft, ist allerdings gegenwärtig die Situation noch recht verworren, indem durch Anwendung verschiedener Methoden zum Teil ziemlich widerspruchsvolle Resultate erhalten worden sind[106–109]. Immerhin ist der zeitliche Ablauf der Virusproduktion nach Infektion der Zellen gut bekannt, und auch über die Herkunft bestimmter chemischer Bestandteile der Viren liegt ein klares Bild vor. So konnte gezeigt werden, dass das Virus-Protein aus dem Aminosäure-«Pool» der Zelle aufgebaut wird und nicht durch Umbau von Zellproteinen entsteht[110]. Weiterhin ergab sich beim Desoxyribonukleinsäure-haltigen Vaccinia-Virus dass für den Aufbau der Virus-Desoxyribonukleinsäure Thymin neu synthetisiert werden muss[111]. In der zentralen Frage, auf welche Weise nämlich die Gegenwart des Virus den normalen Zellstoffwechsel in so tiefgreifender Weise umzugestalten vermag, können allerdings heute leider erst Vermutungen aufgestellt werden.

Radiobiologie. Ähnlich wie im Falle der carcinostatischen Hemmstoffe hat sich auch für die Röntgenstrahlen gezeigt, dass die Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung für sehr viele Zellstämme, gleichgültig ob normalen oder neoplastischen Ursprungs, und gleichgültig ob mit diploider oder polyploider Chromosomenstruktur, nur in sehr engen Grenzen variiert, im Vergleich mit der Empfindlichkeit des Gesamtorganismus jedoch ausserordentlich hoch ist[112]. Die gleiche Empfindlichkeit findet sich auch gegenüber weichen Röntgenstrahlen[113]. Die Schädigung der Zellen bei niedriger Strahlendosierung äussert sich in erster Linie im Verlust der Fähigkeit zu fortgesetzter Vermehrung, unter Ausbildung von Riesenzellformen, wobei jedoch meist noch einige Zellteilungen stattfinden können; die Analyse der Dosiswirkungskurve deutet dabei darauf hin,

[99] J. F. ENDERS, T. H. WELLER und F. C. ROBBINS, Science *109*, 85 (1949).
[100] R. DULBECCO und M. VOGT, J. exp. Med. *99*, 167 (1954).
[101] H. EAGLE und K. HABEL, J. exp. Med. *104*, 271 (1956).
[102] J. E. DARNELL, H. EAGLE und T. K. SAWYER, J. exp. Med. *110*, *445* (1959).
[103] H. E. ALEXANDER, G. KOCH, I. M. MOUNTAIN und G. VAN DAMME, J. exp. Med. *108*, 493 (1958).
[104] J. J. HOLLAND, L. C. MCLAREN und J. T. SYVERTON, J. exp. Med. *110*, 65 (1959).
[105] J. J. HOLLAND, L. C. MCLAREN und J. T. SYVERTON, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *100*, 843 (1959).
[106] H. F. MAASSAB, P. C. LOH und W. W. ACKERMANN, J. exp. Med. *106*, 641 (1957).
[107] G. MIROFF, W. E. CORNATZER und R. G. FISCHER, J. biol. Chem. *228*, 255 (1957).
[108] H. F. MAASSAB und W. W. ACKERMANN, Ann. N. Y. Acad. Sci. *81*, 29 (1959).
[109] N. P. SALZMANN, R. Z. LOCKART und E. D. SEBRING, Virology *9*, 244 (1959).
[110] J. E. DARNELL und L. LEVINTOW, J. biol. Chem. *235*, 74 (1960).
[111] N. P. SALZMANN, Virology *10*, 150 (1960).
[112] T. T. PUCK, D. MORKOVIN, P. I. MARCUS und S. J. CIECIURA, J. exp. Med. *106*, 485 (1957).
[113] S. L. HOOD und G. NORRIS, Biochim. biophys. Acta *36*, 275 (1959).

dass zwei Treffer pro Zelle für eine solche irreversible Schädigung erforderlich sind[114]. Der primäre Schaden, welcher in den Zellen durch die Bestrahlung gesetzt wird, scheint dabei offenbar im genetischen Apparat zu liegen: eine Bestrahlung mit der mittleren letalen Dosis von etwa 50 r bewirkt im Durchschnitt ebenfalls eine morphologisch erkennbare Chromosomenschädigung pro Zelle. Durch solche Chromosomenschäden wird eine normale Mitose in Frage gestellt und auf diese Weise die fortgesetzte Vermehrung der Zellen verunmöglicht[115]. Nach Bestrahlung mit hohen Dosen treten im weiteren in den wenigen überlebenden Zellen auch relativ häufig Mutationen, erkennbar an Änderungen der Morphologie, Chromosomenstruktur oder der Wuchsstoffbedürfnisse, auf[112].

Genetik. Die Möglichkeiten der Zellkulturtechnik liegen hier vor allem in Beiträgen an die Genetik der somatischen Zellen, ein Gebiet, in welchem heute noch sehr wenig bekannt ist, welches aber in Zukunft wesentliches zu den Fragen der embryologischen Differenzierung und der Carcinogenese beitragen dürfte. Bisher ist in erster Linie die Entwicklung von resistenten Zellstämmen untersucht worden. Ähnlich wie bei Mikroorganismen hat es sich gezeigt, dass je nach der Art des verwendeten Hemmstoffes die Resistenz durch eine einzelne Mutation, wie im Falle von 8-Azaguanin[116,117], oder aber durch eine Serie aufeinanderfolgender Mutationen, wie zum Beispiel unter dem Einfluss von Amethopterin[118] zustande kommt.

Von grossem Interesse ist auch die Beobachtung, dass sich in Zellkulturen keine[119], beziehungsweise nur eine geringe[120] Resistenz gegenüber der Einwirkung ionisierender Strahlen entwickeln lässt.

Von hoher Aktualität ist schliesslich die Frage, ob es möglich ist, mittels Desoxyribonukleinsäure genetische Merkmale auf eine Säugerzelle zu übertragen, wie dies für Mikroorganismen mehrfach nachgewiesen worden ist. Dieses Problem ist für die gesamte Genetik somatischer Zellen, insbesondere auch im Hinblick auf den Mechanismus der virusbedingten Carcinogenese, von grösster Bedeutung. Desoxyribonukleinsäureinduzierte, genetische Transformationen an Säugerzellen sind jüngst beschrieben worden[121,122].

Was ist heute an neueren Arbeitsrichtungen auf dem Gebiet der Zellkulturen zu erkennen? Da erscheinen vor allem zweierlei Bestrebungen zu einer Erweiterung der bisherigen experimentellen Möglichkeiten erwähnenswert.

Die eine dieser neuen Entwicklungen betrifft das Studium des Zellteilungszyklus von Säugerzellen. Die im vorhergehenden beschriebenen Methoden gestatten zwar, durch Untersuchung des Wachstums grosser Zellpopulationen in mancher Hinsicht gute Rückschlüsse in bezug auf die Vermehrung der Einzelzelle zu ziehen; über den zeitlichen Ablauf der Prozesse in der einzelnen Zelle von Mitose zu Mitose vermögen sie jedoch keine Auskunft zu geben. Hier setzt nun die Frage nach den Möglichkeiten einer Synchronisierung von Zellkulturen ein, wie sie für Kulturen von Bakterien und Protozoen bereits mehrfach beschrieben worden sind; denn in einer synchronisierten Kultur lassen sich Veränderungen im Laufe des Zellteilungszyklus an der gesamten Zellpopulation verfolgen, für welche beispielsweise eine biochemische Analyse viel leichter durchgeführt werden kann als für eine Einzelzelle. Eine recht befriedigende Synchronisierung von Zellkulturen ist bisher durch vorübergehende Senkung der Inkubationstemperatur[123,124], eine partielle Synchronisierung ausserdem durch die Verwendung von Hemmstoffen für die Thymin-Biosynthese und nachfolgende Zugabe von Thymidin[125,126] erreicht worden. Bis heute liegen jedoch aus der Anwendung solcher synchronisierter Zellkulturen für das biochemische oder pharmakologische Studium des Zellteilungszyklus noch sehr wenige Ergebnisse vor.

Die zweite der erwähnten neueren Arbeitsrichtungen äussert sich im Bestreben, die Kulturbedingungen so zu vervollkommnen, dass sich mit der Zeit sämtliche der im Gesamtorganismus vorkommenden Zelltypen, soweit sie zur Zellteilung überhaupt befähigt sind, in Kultur züchten lassen. Davon sind wir heute noch weit entfernt, und so besteht gegenwärtig eine erste, bescheidenere Zielsetzung in der Kultur von Zellpopulationen, welche die *ex vivo* entnommene Zellpopulation möglichst repräsentieren. Auch dies ist bisher nur in wenigen Fällen gelungen, und eine ganze Reihe von Anhaltspunkten spricht dafür, dass im allgemeinen unter den Bedingungen *in vitro* nur ein geringer Teil der Zellen imstande ist, sich fortgesetzt zu vermehren, und dass deshalb von Anfang an eine intensive Selektion stattfindet[4]. Dies äussert sich einerseits darin, dass das exponentielle Wachstum erst nach Ablauf einer oft recht langen Latenzperiode nach Inkubation der Primärkultur einsetzt, wie beispielsweise im Falle des Mäuse-Sarkoms-180[127]. Anderseits führt die Selektion oft zu einer Änderung der Eigenschaften der Zellpopulation mit fortschreitender Kultur: so ist bei der Kultur eines Zellstammes mit neoplastischen Eigenschaften eine allmählich fortschreitende Abnahme der neopla-

[114] T. T. Puck und P. I. Marcus, J. exp. Med. *103*, 653 (1956).
[115] T. T. Puck, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. *44*, 772 (1958).
[116] W. Szybalski und M. J. Smith, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *101*, 662 (1959).
[117] W. Szybalski, Exp. Cell Res. *18*, 588 (1960).
[118] G. A. Fischer, Cancer Res. *19*, 372 (1959).
[119] R. E. Bases, Cancer Res. *19*, 311 (1959).
[120] J. F. Whitfield und R. H. Rixon, Exp. Cell Res. *19*, 531 (1960).
[121] L. Sachs und D. Medina, Nature *189*, 457 (1961).
[122] K. G. Bemch und D. W. King, Science *133*, 381 (1961).
[123] P. Wildy, Biochem. J. *68*, 14 P (1958).
[124] A. A. Newton und P. Wildy, Exp. Cell Res. *16*, 624 (1959).
[125] M. L. Eidinoff und M. A. Rich, Cancer Res. *19*, 521 (1959).
[126] R. Schindler, Helv. physiol. Acta *18*, C 93 (1960).
[127] G. E. Foley und B. P. Drolet, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *92*, 347 (1956).

stischen Infektivität beobachtet worden[128]. Daneben kommt es oft in Kulturen normaler Zellen zum Auftreten von Zellen mit malignen Eigenschaften, welche sich dann *in vivo* wie Zellen eines transplantierbaren Tumors verhalten[129,130]. Dies deutet darauf hin, dass in der Kultur offenbar auch Mutationen für eine Änderung der Zellcharakteristiken verantwortlich zu machen sind. Besonders augenfällig äussert sich dieser Sachverhalt im Auftreten von Zellen mit veränderter Chromosomenstruktur bei fortgesetzter Kultur *in vitro*, wie dies für viele Zellstämme beschrieben und zum Teil sehr eingehend untersucht worden ist[128,131–134].

Gegenwärtig setzt sich nun mehr und mehr die Ansicht durch, dass solche Veränderungen der Zellcharakteristiken nicht durch die Kultur *in vitro* an sich bedingt sind, sondern auf dem Fehlen optimaler Kulturbedingungen für die betreffende Zellpopulation beruhen, wobei das Problem der optimalen Bedingungen in erster Linie die Zusammensetzung der Nährlösung betrifft. So ist kürzlich gezeigt worden, dass Fibroblastenkulturen über lange Zeit ihre Chromosomenstruktur unverändert beibehalten, wenn das Nährmedium unter Zusatz von Embryoextrakt oder fötalem Serum den Bedürfnissen der Zellen ausreichend angepasst wird[136–138]. Gleicherweise ist es in den letzten Jahren durch Anpassung der Nährlösung an die speziellen Bedürfnisse des betreffenden Zellstammes möglich geworden, eine ganze Reihe von transplantierbaren Tumoren praktisch ohne Latenzzeit *in vitro* zu züchten[21,22,24,138].

Einen Schritt weiter in der Richtung der Kultur repräsentativer Zellpopulationen geht das Bestreben, Zellen mit spezifischen Funktionen *in vitro* zu züchten. Da die morphologischen Eigenschaften unter den Kulturbedingungen kaum als ausreichendes Kriterium für die Erhaltung von Zellfunktionen zu betrachten sind, kommen dafür in erster Linie biochemische Aktivitäten in Frage. Die neoplastische Infektivität, welche zwar in vielen Fällen unter den Kulturbedingungen erhalten bleibt, ist wohl nur mit Vorbehalten als «Zellfunktion» aufzufassen. In Kulturen, welche aus normalen Geweben hergestellt werden, wachsen nun ziemlich regelmässig Zellen mit epithelialer oder mit fibroblastähnlicher Morphologie aus, wobei die spezifischen biochemischen Aktivitäten, wie sie beispielsweise an der Leber besonders gut untersucht sind, bald nicht mehr nachgewiesen werden können. Ein solcher Zellstamm aus Leber wies zwar einen relativ hohen Glykogengehalt auf, hatte dagegen die wohl spezifischere Fähigkeit der Inaktivierung von Östradiol verloren[140], und bei einem anderen, ebenfalls aus Lebergewebe entstandenden Zellstamm[141] waren mehrere für dieses Organ spezifische Enzyme in den Zellen in Kultur nicht mehr nachweisbar[142,142]. An Kulturen von Leber aus Hühnerembryonen ist zudem gezeigt worden, dass das für Leber typische Bild des Kohlehydratstoffwechsels bereits während der ersten 24 h *in vitro* verloren geht[144].

Es stellt sich die Frage, ob dieser Verlust spezifischer Zellfunktionen *in vitro* auf einer Entdifferenzierung der betreffenden Zellen beruht oder aber auf dem Überwuchern anderer, unter den Bedingungen *in vitro* besser zur Vermehrung befähigter Zelltypen, wie Bindegewebs- oder Epithelzellen. Für die zweite dieser Möglichkeiten spricht nun die Tatsache, dass es in zwei Fällen gelungen ist, Zellen mit spezifischen biochemischen Funktionen *in vitro* zu züchten, ohne dass mit fortschreitender Zellvermehrung diese Zellfunktionen verloren gegangen wären. Dies betrifft einerseits Zellen eines Mäuse-Mastocytoms, deren Synthese von Histamin und Serotonin in der Kultur quantitativ erhalten bleibt[24], und anderseits Zellen des Hypophysenvorderlappens, welche ihre Produktion von Hormonen *in vitro* ebenfalls fortführen[145]. In beiden Fällen besteht ein wesentlicher methodischer Kunstgriff in der Abtrennung der funktionellen Zellen von andersartigen, in der ursprünglichen Population mit vorhandenen Zelltypen, wie Fibroblasten oder Histiocyten. Ausserdem ist für die Kultur der neoplastischen Mastzellen eine an deren besondere Nährbedürfnisse angepasste Nährlösung erforderlich. Die Kultur anderer Zelltypen mit spezifischen Funktionen liegt somit offenbar durchaus im Bereich der Möglichkeit, wenn diesen beiden Voraussetzungen, nämlich der Abtrennung von Begleitzellen und der Verwendung eines Nährmediums mit allen für die betreffende Zellart essentiellen Nutrienten, Rechnung getragen wird. Wie weit dabei auch Hormone für die Erhaltung der Zellfunktion eine Rolle spielen, ist gegenwärtig noch kaum vorauszusehen.

128 K. K. Sanford, G. L. Hobbs und W. R. Earle, Cancer Res. *16*, 162 (1956).
129 A. Levan und J. J. Biesele, Ann. N. Y. Acad. Sci. *71*, 1022 (1958).
130 K. K. Sanford, Cancer Res. *18*, 747 (1958).
131 L. Berman, C. S. Stulberg und F. H. Ruddle, Cancer Res. *17*, 668 (1957).
132 T. C. Hsu und P. S. Moorhead, J. nat. Cancer Inst. *18*, 463 (1957).
133 D. K. Ford und G. Yerganian, J. nat. Cancer Inst. *21*, 393 (1958).
134 F. H. Ruddle, L. Berman und C. S. Stulberg, Cancer Res. *18*, 1048 (1958).
135 E. H. Y. Chu und N. H. Giles, J. nat. Cancer Inst. *20*, 383 (1958).
136 T. T. Puck, S. J. Cieciura und H. W. Fisher, J. exp. Med. *106*, 145 (1957).
137 J. H. Tijo und T. T. Puck, J. exp. Med. *108*, 259 (1958).
138 T. T. Puck, S. J. Cieciura und A. Robinson, J. exp. Med. *108*, 945 (1958).
139 T. A. McCoy und R. E. Neumann, J. nat. Cancer Inst. *16*, 1221 (1956).
130 B. B. Westfall, V. J. Evans, J. E. Shannon und W. R. Earle, J. nat. Cancer Inst. *14*, 655 (1953).
131 R. S. Chang, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *87*, 440 (1954).
142 W. F. Perske, R. E. Parks und D. L. Walker, Science *125*, 1290 (1957).
143 V. H. Auerbach und D. L. Walker, Biochim. biophys. Acta *31*, 268 (1959).
144 J. Paul und E. S. Pearson, Exp. Cell Res. *12*, 223 (1957).
145 K. W. Thompson, M. M. Vincent, F. C. Jensen, R. T. Price und E. Shapiro, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *102*, 403 (1959).

Als noch weiter gestecktes Ziel ist schliesslich die Kultur von beliebigen Einzelzellen, soweit sie überhaupt zur Vermehrung befähigt sind, direkt anschliessend an deren Isolierung aus Geweben des Gesamtorganismus zu nennen. Zur Lösung dieser Aufgabe reichen allerdings unsere gegenwärtigen Kenntnisse über die Nährbedürfnisse isolierter Säugerzellen noch bei weitem nicht aus. Ein solches Kultursystem wird jedoch wiederum neue Möglichkeiten eröffnen für das Studium der Verwandtschaft und der Wechselwirkung zwischen verschiedenen Zelltypen sowie für die Bearbeitung von Fragen der embryologischen Differenzierung.

Während sich somit die bisherige Entwicklung auf dem Gebiete der Zellkulturen vor allem mit Fragen des Wachstums und der Zellvermehrung befasst und dabei besonders die grosse Ähnlichkeit vieler verschiedener Zelltypen *in vitro* hervorgehoben hat, scheinen die gegenwärtigen Bestrebungen die Grundlagen zu legen für eine Analyse der Zellfunktion, der Zelldifferenzierung und vermutlich auch der neoplastischen Entartung, wobei neben dem Gemeinsamen wohl auch immer mehr die Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen des Gesamtorganismus hervortreten werden.

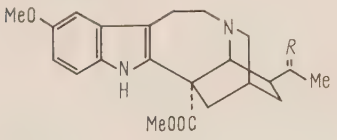
Summary. In this brief review, the development of modern quantitative methods for the cultivation of mammalian cells *in vitro* is described, and present knowledge of their nutritional requirements is presented. In addition, some applications of these techniques in biochemistry, pharmacology, virology, genetics, and radiobiology are discussed.

Brèves communications – Kurze Mitteilungen – Brevi comunicazioni – Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions experimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Voacanga-Alkaloide IV[1]. Struktur von Voacryptin und Voacristin

Für das aus Stammrinden von *Voacanga africana* Stapf isolierte Nebenalkaloid Voacryptin, $C_{22}H_{26}N_2O_4$, hatten wir auf Grund spektraler und analytischer Daten die Struktur eines Oxovoacangins vermutet[2]. Nachdem für Voacristin, $C_{22}H_{28}N_2O_4$, die Konstitution eines Hydroxyvoacangins abgeleitet worden ist[1,3], lag es aus biogenetischen Gründen nahe, für beide Stoffe die gleiche Stellung des O-Atoms am Voacangingerüst anzunehmen. Diese Hypothese konnte durch direkte Überführung von Voacryptin in Voacristin experimentell gesichert und für Voacryptin die Struktur (I) des 20-Oxovoacangins bewiesen werden; Voacristin ist demnach 20-Hydroxyvoacangin (II)[4].



I R: =O

II R: $<^{H}_{OH}$

III R: H_2 (H statt –COOMe)

Voacryptin besitzt eine Carbonylgruppe (5,83 μ in CH_2Cl_2)[2], die durch Darstellung eines *Oxims*, Smp. 114 bis 116°, chemisch gesichert ist. Die Lage der Carbonylabsorption lässt auf eine aliphatische oder alicyclische Ketogruppe schliessen. Einen indirekten Hinweis auf die Stellung dieser Oxofunktion liefert die Chromsäure-Oxydation des Voacryptins: unter den drastischen Bedingungen der Bestimmung nach Kuhn-Roth konnte eine C-Methylgruppe nahezu quantitativ erfasst werden[2]. Nach Oxydation unter milderen Bedingungen[6] konnte papierchromatographisch nur Essigsäure und keine Propionsäure nachgewiesen werden, was gegen das Vorliegen einer C-Aethylgruppe, nicht aber gegen eine CH_3CO-Seitenkette[7] spricht. Die nach HUANG-MINLON[8] ausgeführte Wolff-Kishner-Reduktion lieferte unter gleichzeitiger Decarbomethoxylierung[9] direkt *Ibogain* (III)[10], wodurch die 20-Stellung der Ketogruppe sowie das den Isochinuclidinalkaloiden gemeinsame Grundgerüst[11] für Voacryptin bewiesen ist.

Die Reduktion des Voacryptins mit Kaliumborhydrid verläuft sterisch nicht einheitlich. Aus dem Gemisch diastereomerer Dihydrovoacryptine konnte nach Acetylierung als Hauptprodukt ein in allen Eigenschaften mit *Voacristin-acetat*[1,10] identisches O-Acetat erhalten werden. In den Mutterlaugen fand sich *20*-epi-*Voacristin*-O-*acetat*, Smp. ca. 180°[12].

Summary. Voacryptine is demonstrated to be 20-oxovoacangine. On reduction, it furnishes voacristine (20-hydroxyvoacangine) and 20-*epi*-voacristine.

U. RENNER[13] und D. A. PRINS

Wissenschaftliche Laboratorien der J. R. Geigy AG., Basel, 14. Dezember 1960.

[1] 3. Mitt. U. RENNER und D. A. PRINS, Exper. *15*, 456 (1959).
[2] U. RENNER, Exper. *15*, 185 (1959).
[3] D. STAUFFACHER und E. SEEBECK, Helv. chim. Acta *41*, 169 (1958).
[4] Iboxygain[5] (= Decarbomethoxyvoacristin[1] = Decarbomethoxyvoacangarin[3]) ist somit 20-Hydroxyibogain. (Anmerkung bei der Korrektur, 16. Feb. 1961). Inzwischen ist die 20-Stellung der Hydroxylgruppe auch auf anderm Wege eindeutig gesichert worden: K. BIEMANN und M. FRIEDMANN-SPITELLER, Tetrahedron Letters *2*, 1961, im Druck. Wir danken Herrn Prof. BIEMANN für die freundliche Überlassung seines Manuskriptes.
[5] R. GOUTAREL, F. PERCHERON und M. M. JANOT, C. R. Acad. Sci. Paris, *246*, 279 (1958).
[6] H. BICKEL, H. SCHMID und P. KARRER, Helv. chim. Acta *38*, 649 (1955).
[7] Auch der positive Ausfall der qualitativen Jodoformprobe spricht für das Vorliegen einer CH_3CO-Gruppierung.
[8] HUANG-MINLON, J. Amer. chem. Soc. *68*, 2587 (1946).
[9] U. RENNER, D. A. PRINS und W. G. STOLL, Helv. chim. Acta *42*, 1572 (1959).
[10] Vergleiche mit authentischen Präparaten, Misch-Smp., IR-Spektrum und spez. Drehung.
[11] M. F. BARTLETT, D. F. DICKEL und W. I. TAYLOR, J. Amer. chem. Soc. *80*, 126 (1958).
[12] Vermutlich noch nicht ganz rein. Misch-Smp. mit Voacristinacetat zeigt Depression von rund 20°. Im IR-Spektrum fehlen die Banden der MeCO-Gruppe.
[13] Den HH. Dres. E. GIROD, H. WAGNER und ihren Mitarbeitern danken wir für Spektren und Mikroanalysen.

Sur le mycoside C_m, nouveau peptido-glycolipide isolé de *Mycobacterium marianum*[1]

L'extraction de *Mycobacterium marianum* par le mélange alcool-éther (1:1) puis par le chloroforme, fournit 33% de lipides totaux[2]. L'extrait éthéro-alcoolique, après évaporation des solvants, donne une fraction insoluble dans l'éther et dans l'eau; ces caractères de solubilité ont déjà été observés pour des composés de nature peptido-lipidique[3] ou peptido-glycolipidique[4].

Purification. La substance insoluble dans l'éther est dissoute dans le chloroforme; la solution est passée sur filtre Seitz puis sur colonne de poudre de cellulose pour éliminer les amino-acides libres éventuellement présents[5].

Après évaporation du solvant, on obtient une substance incolore que l'on purifie par chromatographie sur colonne de trisilicate de magnésium activé. Le chloroforme élue 22% du produit initial, le mélange chloroforme-méthanol (95:5), 54%.

Nous avons étudié cette dernière fraction; sa structure est assez voisine de celle du *mycoside C*, peptido-glycolipide caractéristique de *M. avium*[4,6,7]; nous proposons pour cette substance le nom de *mycoside* C_m.

Propriétés. C'est un solide incolore F.: 198–200°, $[\alpha]_D = -31°$ ($CHCl_3$), insoluble dans l'eau et dans l'éther, peu soluble à froid dans le méthanol et l'éthanol, très soluble dans le chloroforme et l'acide acétique glacial. Le spectre IR, pratiquement identique à celui du mycoside C[4,6,7], indique la présence du groupement acétyle (1225 cm^{-1}), et de la liaison peptidique (1530, 1630, et 3300 cm^{-1}).

Composition. La substance est exempte de soufre et de phosphore. L'analyse élémentaire donne: C% 64,65, 64,22; H% 8,52, 8,87; N% 4,70; (O)-CH_3% 2,44, 2,41; (CO)-CH_3% 2,28. Le poids moléculaire déterminé par la microméthode de Barger[8] modifiée par Rast[9] est voisin de 2000. L'hydrolyse acide totale donne environ 40% d'une partie lipidique éthérosoluble et une partie hydrosoluble contenant des acides aminés et des sucres. La recherche du glycérol et de l'inositol est négative.

Fraction aminée. Trois acides aminés sont décelés par chromatographie mono- et bidimensionnelle sur papier avec différents solvants: la thréonine, l'alanine et la phénylalanine. L'étude microbiologique[6] et la chromatographie sur Dowex 50 × 4 selon la méthode de Moore et Stein[10] ont permis de préciser la nature et la proportion molaire des acides aminés; il s'agit de D-*allo-thréonine*, de D-*alanine* et de D-*phénylalanine* en proportion 3:3:1. D'après la teneur en azote et le poids moléculaire on peut conclure que le mycoside C_m contient sept molécules d'acides aminés.

Fraction glucidique. La chromatographie sur papier de l'extrait aqueux après hydrolyses chlorhydriques répétées selon MacLennan[11] montre 2 taches révélables par le phtalate d'aniline et par le système periodate-benzidine. La chromatographie préparative sur papier dans le système acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3) donne 2 composés de Rf très différents et nettement supérieurs à ceux des hexoses et des pentoses. S_1: Rrh = 1,31; S_2: Rrh = 3,13 (Rrh = Rf par rapport au rhamnose). La présence de 6-désoxyhexoses, O-méthylés ou non, ayant été signalée dans les substances lipidiques isolées de plusieurs Mycobactéries[12] en particulier dans le mycoside C de *Mycobacterium avium*[4,7,11], nous avons utilisé le test de Dische et Shettles[13] spécifique des 6-désoxyhexoses pour l'identification de S_1 et S_2. Les courbes d'absorption en milieu cystéine-acide sulfurique, identiques pour S_1 et S_2 et pour le rhamnose témoin, ont montré que ces deux sucres étaient effectivement des 6-désoxyhexoses.

a) *Nature de* S_1. L'examen des Rf en présence de 6-désoxy-talose et d'autres 6-désoxyhexoses authentiques[14] dans plusieurs solvants: butanol-pyridine-eau (6:4:3), acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3), butanol-éthanol-eau (5:1:4) permet d'affirmer que S_1 est le *6-désoxy-talose*. Il reste inchangé après déméthylation par BCl_3[15], l'analyse montre l'absence de groupements (O)-CH_3. D'autre part, les points de fusion de S_1 (F: 112–120°) et du 6-désoxytalose (F: 116–118°) sont pratiquement identiques; le point de fusion du mélange ne subit pas de dépression. Les quantités de S_1 disponibles n'ont pas permis de mesurer la rotation.

b) *Nature de* S_2. Le comportement chromatographique de S_2 est celui d'un di-O-méthyl-6-désoxyhexose. Après déméthylation par BCl_3[15] la chromatographie sur papier donne trois taches. L'une correspond à l'ose initial, l'autre à un 6-désoxyhexose monométhylé, la troisième à un 6-désoxyhexose. Dans de nombreux solvants, ce dernier se comporte comme le rhamnose. S_2 est donc un di-O-méthyl-rhamnose.

D'autre part, il est révélable par le système periodate-benzidine; or, parmi les dérivés diméthylés, seul le 3,4-di-O-méthylrhamnose, qui possède deux hydroxyles, adjacents, réagit avec le periodate. Par chromatographie sur papier dans plusieurs solvants: butanol-pyridine-eau (6:4:3), acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3), butanol-éthanol-eau (5:1:4), S_2 a le même Rf que le *3,4-di-O-méthyl rhamnose*.

Le pouvoir rotatoire indique qu'il s'agit du dérivé L: $[\alpha]_D = +20° \pm 2°$ (H_2O), $[\alpha]_D$ théorique $= +18{,}5°$[16].

Le dosage par spectrophotométrie après hydrolyse selon MacLennan[11] donne 20,4% de sucres totaux. Le dosage de chaque sucre après chromatographie sur papier, élution et spectrophotométrie donne S_1: 7%, S_2: 13,4%. Il y a donc une *molécule de 6-désoxy-talose* et *deux moles de 3,4-di-O-méthyl-L-rhamnose*.

Fraction lipidique. Quand on hydrolyse le mycoside C_m par HCl *N* selon MacLennan[11] on obtient une partie lipidique azotée; l'hydrolyse totale de cette substance

[1] 60ème communication sur les constituants des Mycobactéries; 59ème comm. voir: ref. 7.
[2] G. Michel, Thèse de Doctorat, Paris 1958; Bull. Soc. Chim. Biol. *41*, 1649 (1959).
[3] M. Guinand, G. Michel et E. Lederer, C. R. Acad. Sci. *246*, 848 (1958).
[4] C. W. Smith, H. M. Randall, A. P. Maclennan et E. Lederer, Nature *186*, 888 (1960).
[5] C. H. Lea et D. N. Rhodes, Biochem. J. *54*, 467 (1953).
[6] M. Ikawa, E. E. Snell et E. Lederer, Nature *188*, 538 (1960).
[7] P. Jollès, F. Bigler, T. Gendre et E. Lederer, Bull. Soc. Chim. Biol., sous presse.
[8] G. Barger, Ber. *37*, 1754 (1904).
[9] K. Rast, Ber. *54*, 1979 (1921).
[10] S. Moore et W. H. Stein, J. biol. Chem. *211*, 893 (1954).
[11] A. P. MacLennan, Communication personnelle.
[12] A. P. MacLennan, D. W. Smith et H. M. Randall, Biochem. J. *74*, 3 P (1960).
[13] Z. Dische et L. B. Shettles, J. biol. Chem. *175*, 595 (1948).
[14] Nous remercions les Professeurs E. L. Hirst (Edinburgh), T. Reichstein (Bâle) et G. F. Springer (Philadelphia) pour des échantillons de 6-désoxyhexoses et de leurs dérivés.
[15] S. Allen, T. G. Bonner, E. J. Bourne et N. M. Saville, Chem. and Ind. *1958*, 630.
[16] R. S. Tipson, C. C. Christman et P. A. Levene, J. biol. Chem. *128*, 609 (1939).
[17] G. Michel, C. Bordet et E. Lederer, C. R. Acad. Sci. *250*, 3518 (1960).
[18] Ce travail a bénéficié d'une subvention de la Fondation Waksman pour le développement des Études microbiologiques en France, et d'une subvention du National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Grant E 28 38).

libère de *la phénylalanine* et une fraction acide éthérosoluble qui représente 42% du mycoside C_m initial. Après estérification par le diazométhane, cette fraction est chromatographiée sur colonne d'acide silicique. L'analyse élémentaire de l'ester élué par benzène-éther (9:1) donne C% 80,45; H% 13,02; (O)-CH_3% 1,1. Calculé pour $C_{51}H_{98}O_3$: C % 80,67; H %12,91; (O)-CH_3% 2,0. Le spectre infra-rouge indique la présence d'une fonction alcool. En attendant un examen plus approfondi de cette substance, la formule brute ci-dessus doit être considérée comme tout à fait provisoire.

Rappelons, cependant, que nous venons d'isoler de *Nocardia asteroides* un acide mycolique $C_{50}H_{96}O_3 \pm 3\ CH_2$ que nous avons appelé acide nocardique[17].

Le dosage des *groupements acétyles* effectué sur le mycoside C_m indique la présence de 3 CO-CH_3 par mole; trouvé: (CO)-CH_3% 2,28; calculé pour 3 (CO)-CH_3% 2,15.

Structure partielle du mycoside C_m. La molécule du mycoside C_m contient donc les constituants suivants: 7 molécules d'acides aminés (un D-Phe, trois D-*allo*-Thr., et trois D-Ala = $C_{30}H_{59}N_7O_{17}$), trois molécules de sucres (un 6-désoxy-talose, deux 3,4-di-O-méthyl-L-rhamnose = $C_{22}H_{44}O_{15}$), une partie lipidique de formule approximative $C_{50}H_{96}O_3$ et trois groupements acétyle. La formule brute du mycoside C_m serait $C_{108}H_{185}N_7O_{28}$, ce qui est en assez bon accord avec les valeurs trouvées.

$C_{108}H_{185}N_7O_{28}$	calculé	C 63,90	H 9,18	N 4,82	(O)-CH_3 2,95
	trouvé	64,22	8,87	4,70	2,44

Les résultats exposés ci-dessus permettent d'attribuer au mycoside C_m la formule provisoire (I).

$$\overbrace{C_{49}H_{94}}\text{–}\overset{OH}{\overset{|}{C}}\text{–}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{–D–Phe . (D-}\textit{allo}\text{-Thr}_3\text{,D-Ala}_3\text{)} \left\{ \begin{array}{l} \text{(3,4-di-O-méthyl-L-rhamnose)}_2 \\ \text{6-désoxy-talose} \\ \text{(O-acétyle)}_3 \end{array} \right. \quad \text{(I)}$$

Rappelons que le mycoside C_1 de *M. avium* contient les trois mêmes acides aminés, mais en proportions différentes (un D-Phe, deux D-*allo*-Thr et deux D-Ala) et trois désoxyhexoses différents en quantité équimoléculaire, dont le 6-désoxy-talose et le 3,4-di-O-méthyl-rhamnose[7].

Dans le mycoside C_1 c'est également la D-phénylalanine qui est amidifiée, avec le carboxyle de la partie lipidique.

Summary. Mycoside C_m, m.p. 198–200° $[\alpha]_D = -31°$ ($CHCl_3$), a new peptido-glycolipid isolated from *Mycobacterium marianum*, has the approximate molecular formula $C_{108}H_{185}N_7O_{28}$ and gives on hydrolysis seven molecules of D-amino acids (one D-phenylalanine, three D-*allo*-threonine, three D-alanine), three molecules of 6-deoxyhexoses (one 6-deoxy-talose of as yet undetermined configuration and two molecules of 3,4-di-O-methyl-L-rhamnose); the lipid moiety of mycoside C_m is a hydroxy-acid of approximate formula $C_{50}H_{96}O_3$; three O-acetyl groups are also present. The preliminary formula (I) is proposed for mycoside C_m.

MAUD CHAPUT, G. MICHEL et E. LEDERER[18]

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté catholique des Sciences, Lyon (France), et Institut de Biologie physico-chimique, Paris (France), le 4 novembre 1960.

Eine neue Isomerisierungsreaktion der Mutterkornalkaloide vom Peptidtypus[1]

Mit den neu zur Verfügung stehenden analytischen Methoden wurde festgestellt, dass sich am Ergotamin in Lösung neben der schon lange bekannten Epimerisierung am Kohlenstoffatom 8 des Lysergsäureteils eine weitere Umlagerungsreaktion abspielt. Diese Isomerisierung beobachtet man auch bei allen anderen natürlichen Mutterkornalkaloiden vom Peptidtypus, ebenso bei ihren Dihydroderivaten, dagegen nicht beim Ergobasin und den anderen einfachen Lysergsäureamiden. Daraus geht hervor, dass die Umlagerung im Peptidteil des Moleküls vor sich geht.

Die neuen Isomeren bilden sich in saurer Lösung, weshalb wir sie durch die Vorsilbe «Aci» kennzeichnen möchten. Sie bilden sich beim Kochen der Lösungen schon nach wenigen Minuten. Die gleichen Verbindungen entstehen langsam auch bei Raumtemperatur, denn sie liessen sich ebenfalls in mehrere Jahre gelagerten pharmazeutischen Präparaten nachweisen.

Die Umlagerung ist reversibel. So entsteht ausgehend von Ergotamin oder Aci-ergotamin ein Gleichgewicht, zwischen Ergotamin, Aci-ergotamin, Ergotaminin und Aci-ergotaminin; ausgehend von Dihydro-ergotamin oder Aci-dihydro-ergotamin ein Gemisch von Dihydro-ergotamin und Aci-dihydro-ergotamin. Untersuchungen zur Abklärung des Chemismus der Aci-Isomerie sind im Gange.

Die Aci-Verbindungen lassen sich von den Ausgangsalkaloiden mittels chromatographischer Methoden abtrennen. Sie zeigen gute Kristallisationseigenschaften. Da der Chromophor des Moleküls, der Lysergsäure- bzw. der Dihydro-lysergsäure-Teil, von der Isomerisierung nicht betroffen wird, zeigen die Aci-Formen die gleichen UV-Spektren wie die entsprechenden Ausgangsmaterialien. Die spezifischen Drehwerte weisen geringe, doch deutliche Unterschiede auf.

Aci-ergotamin kristallisiert aus Methanol in Nadeln vom Smp. 185–187° (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = -32°$ ($\pm 3°$) (c = 1,2 in Pyridin). Für die Analyse wurde die Substanz, gleich wie die beiden nachstehenden Präparate, im Hochvakuum bei 120° getrocknet. $C_{33}H_{35}O_5N_5$, ber. C 68,1%, H 6,1%, N 12,0%; gef. C 67,8%, H 6,6%, N 11,9%. UV-Spektrum in Methanol: Maxima bei 245 mμ (4,3), 312 mμ (3,9).

Aci-ergotaminin kristallisiert aus Methanol/Äther in feinen Nadeln, Smp. 203° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = +258°$ (± 2) (c 1,2 in Pyridin. $C_{33}H_{35}O_5N_5$, ber. C 68,1%, H 6,1%, N 12,0%; gef. C 67,5%, H 6,1%, N 12,0%. UV-Spektrum in Methanol: Maxima bei 239 mμ (4,3), 311 mμ (3,9).

Aci-dihydro-ergotamin kristallisiert aus Methanol in Nadeln vom Smp. 188° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -96°$ ($\pm 2°$) (c = 1,3 in Pyridin). $C_{33}H_{37}O_5N_5$, ber. C 67,9%, H 6,4%, N 12,0%; gef. C 68,0%, H 6,8%, N 12,0%. UV-Spektrum in Methanol: Maxima bei 221 mμ (4,5), 280 mμ (3,8), 291 mμ (3,7).

Über die pharmakologische Wirksamkeit der Aci-Mutterkornalkaloide, die gegenüber den Ausgangsverbindungen im allgemeinen abgeschwächt ist, wird demnächst an anderer Stelle berichtet.

Summary. Ergot alkaloids of the peptide type and their dihydro-derivatives can be converted reversibly in acid solution into isomeric compounds. They are characterised by the prefix 'aci', e.g. aci-ergotamine, aci-dihydro-ergotamine. The isomerisation takes place in the peptide part of the molecule.

W. SCHLIENTZ, R. BRUNNER, F. THUDIUM und A. HOFMANN

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium SANDOZ, Basel, 2. Februar 1961.

[1] 49. Mitteilung über Mutterkornalkaloide. 48. Mitt. s. Helv. chim. Acta *42*, 2696 (1959).

Zur Bildung mittelkettiger Fettsäurereste in elektronenbestrahlten Fetten

Bei der Einwirkung ionisierender Strahlen auf Fette und Fettsäuren treten als Spaltprodukte H_2, CO_2, CO, Kohlenwasserstoffe[1], Carbonylverbindungen[2] und Säuren[3] auf. Zur Klärung der Frage, wo die Fettsäurekette aufspaltet, eignet sich die gaschromatographische Spurenanalyse. Zu diesem Zweck wurden Glyceride und freie Fettsäuren nach Bestrahlung mit 100 Mrad (Elektronen, 2 MeV, Van-de-Graaff-Generator) in die Methylester übergeführt.

1. Wie man aus Figur a sieht, treten bei gesättigten Triglyceriden (Tripalmitin) nach Bestrahlung vermehrt Bruchstücke auf, die aus C_8-Säuren bzw. deren Estern bestehen. (Die in Tripalmitin und Palmitinsäure ohne Bestrahlung enthaltenen mittelkettigen Fettsäuren sind Verunreinigungen.) Besonders stark ist die Bildung von $C_8^=$-Säuren (Fettsäurereste mit 8 Kohlenstoffatomen und einer Doppelbindung), etwas weniger die von C_7^--Säuren; $C_6^=$-Säuren entstehen nur in Spuren (C_8^-:C_7^-:$C_6^=$ ≈ 1:0,3:0,1). Ausserdem treten geringe Mengen von gesättigten Fettsäureresten auf ($C_{15} > C_9 > C_{11} > C_7$). Aus diesem Ergebnis lässt sich folgern, dass ausser einer Abtrennung der endständigen CH_3-Gruppen die Aufspaltung der mittelständigen C–C-Bindungen besonders leicht erfolgt (↓), wobei vorwiegend ungesättigte, daneben aber auch gesättigte Bruchstücke entstehen (Gl. 1).

$$(CH_2)_6\ CH_2\ CH_2\text{-}(CH_2)_6\text{–}COOR \xrightarrow{-H} CH_2\text{–}CH\text{–}(CH_2)_5\text{–}COOR \quad (1)$$
$$\xrightarrow{+H} CH_3\text{–}(CH_2)_6\text{–}COOR$$

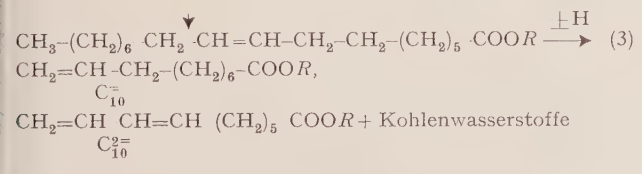
Ähnlich wie Tripalmitin verhält sich auch Rinderfett.

2. In bestrahlter Palmitinsäure (Fig. b) sind die oben beschriebenen Komponenten ebenfalls nachzuweisen. Ausserdem treten noch Bruchstücke auf, die von C_{13} und wahrscheinlich von $C_{13}^=$- und $C_{14}^=$-Säureresten herrühren. Wie aus den Flächen der Komponenten (Fig. b) ersichtlich, ist Palmitinsäure gegen Bestrahlung weitaus empfindlicher als ihr Triglycerid. Besonders hoch ist die Konzentration an $C_8^=$- und C_{15}-Säuren ($C_{15} > C_{11} > C_{13}$; $C_8^=$:$C_7^=$:$C_6^=$ ≈ 1:0,01:0,007).

3. Bei Fetten mit hohem Gehalt an Ölsäure (Olivenöl) (Fig. c) treten nach Bestrahlung vor allem Verbindungen auf, bei denen es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um C_8^-, C_{10}^-, $C_{10}^{2=}$- und C_{11}-Säurereste handelt. Ausserdem werden geringere Mengen an $C_8^=$-, C_7- und C_9-Säuren beobachtet. Ähnlich wie Olivenöl verhält sich auch bestrahltes Erdnussöl (Fig. d). Das Verhältnis der hauptsächlich auftretenden mittelkettigen Säurereste beträgt für

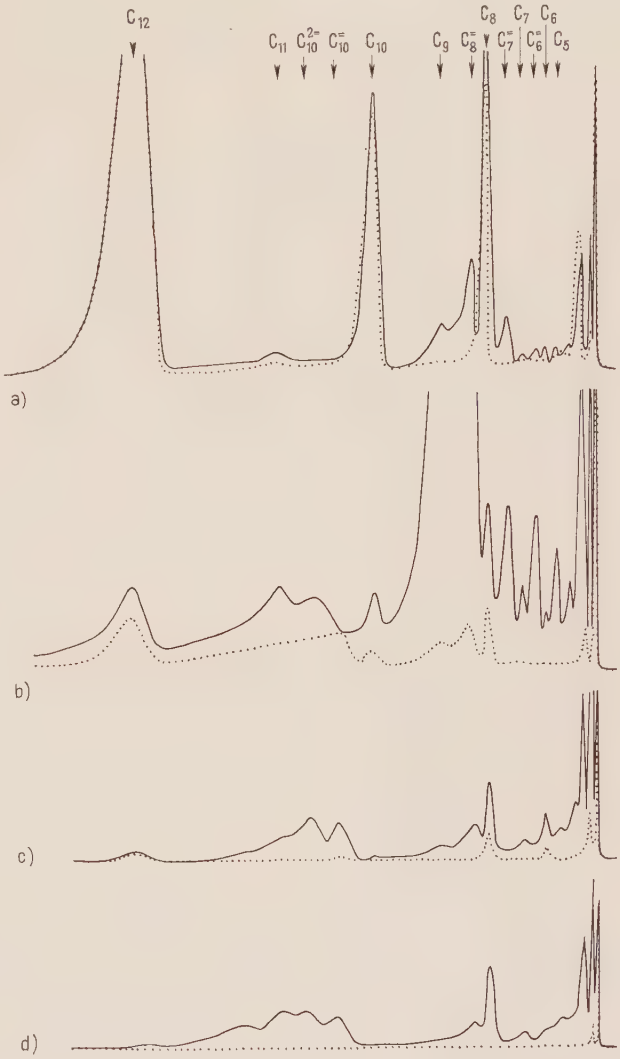
Erdnussöl (100 Mrad): C_8:$C_8^=$:$C_{10}^=$:$C_{10}^{2=}$:C_{11} ≈ 1:0,5:0,9:1,7:1,0 und für Olivenöl (100 Mrad): C_8:$C_8^=$:$C_{10}^=$:$C_{10}^{2=}$:C_{11} ≈ 1:0,7:1,4:2,2:0,7. Daraus folgt, dass der Ölsäurerest weniger an der Doppelbindung als vielmehr bevorzugt an der der Doppelbindung benachbarten C–C-Bindung gespalten wird (Gl. 2 und 3; die Lage der Doppelbindungen in den Produkten ist noch ungeklärt, ebenso das Auftreten von Verzweigungen).

$$CH_3\text{–}(CH_2)_6\text{–}CH_2\text{–}CH{=}CH\text{–}CH_2\text{–}CH_2\text{–}(CH_2)_5\ COOR \xrightarrow{\pm H} \quad (2)$$
$$(11\ \ 10\ \ 9\ \ 8\ \ 7)$$
$$CH_3\text{–}(CH_2)_6\text{–}COOR,\ CH_2{=}CH\text{–}(CH_2)_5\text{–}COOR + \text{Kohlen-}$$
$$C_8 \qquad\qquad C_8^= \qquad\qquad \text{wasserstoffe}$$



$$CH_3\text{–}(CH_2)_6\ CH_2\text{–}CH{=}CH\text{–}CH_2\text{–}CH_2\text{–}(CH_2)_5\ COOR \xrightarrow{\pm H} \quad (3)$$
$$CH_2{=}CH\text{–}CH_2\text{–}(CH_2)_6\text{–}COOR,$$
$$C_{10}^=$$
$$CH_2{=}CH\ CH{=}CH\ (CH_2)_5\ COOR + \text{Kohlenwasserstoffe}$$
$$C_{10}^{2=}$$

4. Bei Sojaöl mit seinem hohen Gehalt an Linolsäure liegen ähnliche Verhältnisse wie bei Oliven- und Erdnussöl vor. Es treten nur relativ mehr C_{11}- und C_{11}^--Säurereste auf, was dafür spricht, dass die Linolsäure bevorzugt zwischen den beiden Doppelbindungen aufgespalten wird.



Gaschromatographische Spurenanalyse der bei der Bestrahlung auftretenden mittelkettigen Fettsäurereste (getrennt als Methylester). a) Tripalmitin, b) Palmitinsäure, c) Olivenöl, d) Erdnussöl. —— bestrahlt mit 100 Mrad, · · · · · unbestrahlt. (Kolonne: Resoflex R 446, 360 cm, 2,1 atü H_2, 188°C, eingespritzte Menge 0,05 ml)

[1] C. W. Sheppard und V. L. Burton, J. Amer. chem. Soc. *68*, 1636 (1946). – C. W. Sheppard und W. L. Whitehead, Bull. Amer. Ann. Pet. Geol. *30*, 38 (1946). – W. L. Whitehead, C. Goodman und I. A. Breger, J. Chim. phys. *48*, 184 (1951). – R. E. Honig, Science *104*, 27 (1946).

[2] J. R. Chipault, O. S. Privett, G. R. Mizumo, E. C. Nickell und W. O. Lundberg, Ind. eng. Chem. *49*, 1713 (1957). – D. A. Lang und B. E. Proctor, J. Amer. Oil Chem. Soc. *33*, 237 (1956). – K. Täufel, R. Zimmermann und R. Huber, Naturwissenschaften *47*, 355 (1960). – L. R. Dugan und P. W. Landis, J. Amer. Oil Chem. Soc. *36*, 535 (1959). – L. A. Witting und B. S. Schweigert, J. Amer. Oil Chem. Soc. *35*, 413 (1958).

[3] H. T. Slover und L. R. Dugan, J. Amer. Oil Chem. Soc. *34*, 333 (1957).

Summary. Investigations of the chemical changes in fats subjected to cathode rays (100 Mrad) indicated the formation of shorter fatty acid chains. Besides splitting off the terminal methyl groups, especially the medial C–C-bonds are readily split and saturated and unsaturated C_6–C_{11}-fragments are formed. The double bond is relatively resistant, but the C–C-bond near the double bond is easily fractured.

H. Lück und R. Kohn

Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, München, 2. Dezember 1960.

Isolement dans le plasma veineux périphérique et surrénalien de l'ester-sulfate de 5-androstène 3β-ol 7,17-dione

La 5-androstène 3β-ol 7,17-dione (7-oxo-DHEA) a été déjà isolée[1] et identifiée[2] dans les urines humaines sans que les modalités de sa conjugaison aient été définies. Nous rapportons ici l'isolement de ce stéroïde dans le plasma veineux périphérique et surrénalien d'une malade porteuse d'une tumeur virilisante surrénalienne[3], dans la tumeur surrénalienne d'une autre malade, et dans le plasma veineux périphérique d'autres sujets. Nous démontrons la sulfoconjugaison de ce stéroïde. C'est le quatrième ester-sulfate de 17-CS isolé dans le sang[4].

Chez une malade porteuse d'une tumeur cortico-surrénalienne, 40 ml de plasma périphérique et 30 ml de plasma veineux surrénalien ont été étudiés ainsi que 15 ml de sang exsudé de la tumeur pendant les manipulations précédant son broyage. Après lyophilisation ils ont été extraits au Kumagawa par l'hexane, le benzène et le dichlorométhane et, dans cette fraction contenant des graisses et des stéroïdes libres, nous n'avons pas trouvé de 7-oxo-DHEA. Chaque résidu a été extrait ensuite par le méthanol; cette fraction alcoolique a été chromatographiée sur florisil et les éluats acétono-méthanoliques et acétono-éthanoliques (98–2) ont été étudiés par chromatographie sur papier dans les systèmes B 5–10[4] et B 23–9 (non publié).

Les chromatogrammes ont été traités par le réactif de Zimmermann, le réactif au bleu de méthylène pour les esters-sulfates selon Crépy[5] et le trichlorure d'antimoine en milieu acétique[6]. Une substance ayant le comportement chromatographique et chimique de l'ester-sulfate de 7-oxo-DHEA (S-7-oxo-DHEA) de synthèse tel qu'il est décrit plus loin, a été mis en évidence. Après solvolyse[7] des mêmes éluats acétono-alcooliques de la colonne de florisil, les stéroïdes libres ont été chromatographiés sur papier dans le système hexane-benzène (1–1)-propanediol; on a mis en évidence un composé réagissant avec le métadinitrobenzène, bleu en lumière de Wood après action du $SbCl_3$, absorbant sur papier à 250 mμ et ayant la polarité de la 7-oxo-DHEA de synthèse. Son acétate rechromatographié dans le système heptane-2-phénoxyéthanol se comportait comme celui de 7-oxo-DHEA.

Au total, la solubilité initiale dans le méthanol à l'exclusion du benzène et du dichlorométhane, les comportements en chromatographie d'adsorption et de partage, la réaction au bleu de méthylène et la solvolyse par l'acétate d'éthyle témoignent de la sulfo-conjugaison du stéroïde. Celui-ci d'après l'absorption UV, les réactions de coloration, sa polarité et celle de son acétate, ne peut être que de la 7-oxo-DHEA. La conjonction de toutes ces données, compte tenu de la grande sélectivité des systèmes de chromatographie employés, constitue une identification qui, pour être incomplète, semble cependant suffisante. Les quantités trop faibles de produit ne nous ont pas

	Cas 1 virilisme tumeur surrénalienne	Cas 2 virilisme tumeur surrénalienne	Cas 3 syndrome de Cushing carcinome surrénalien	Cas 4 virilisme	Cas 5 hirsutisme	Cas 6 hirsutisme + ACTH
Tumeur surrénalienne[a]						
S-DHEA	120	500	150	–	–	–
S-7-oxo-DHEA	+°	+°	+	–	–	–
Sang exsudé de la surrénale[b]						
S-DHEA	500	–	–	–	–	–
S-7-oxo-DHEA	+	–	–	–	–	–
Sang veineux surrénalien[b]						
S-DHEA	535	–	–	–	–	–
S-7-oxo-DHEA	100	–	–	–	–	–
Sang veineux périphérique[b]						
S-DHEA	340	800	180	100	50	100
S-7-oxo-DHEA	60	+°	65	15	20	+

[a] µg/tumeur
[b] µg/100 ml plasma

S-DHEA et S-7-oxo-DHEA

+ – détecté, non mesuré
° – identité probable, mais non vérifiée

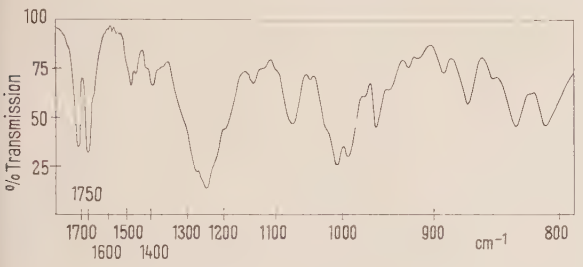
[1] S. Lieberman, K. Dobriner, B. R. Hill, L. F. Fieser et C. P. Rhoads, J. biol. Chem. *172*, 263 (1948).
[2] D. K. Fukushima, A. D. Kemp, R. Schneider, M. B. Stokem et T. F. Gallagher, J. biol. Chem. *210*, 129 (1954).
[3] É. E. Baulieu, C. R. Acad. Sci. *215*, 1421 (1960).
[4] É. E. Baulieu, J. clin. Endocrinol. Metab. *20*, 900 (1960).
[5] O. Crepy et O. Judas, Rev. Fse. Et. Clin. Biol. *5*, 284 (1960).
[6] R. Neher et A. Wettstein, Helv. chim. Acta *34*, 2278 (1951).
[7] S. Burstein et S. Lieberman, J. biol. Chem. *233*, 331 (1959).
[8] J. R. Billeter et K. Miescher, Helv. chim. Acta *31*, 629 (1948).
[9] H. B. Kagan et J. Jacques, Bull. Soc. Chim. Fr. *1960*, 1551.
[10] K. Dobriner, E. R. Katzenellenbogen et R. N. Jones, Infrared Adsorption Spectra of Steroids. An Atlas (Interscience Inc., New York 1953).
[11] R. Emiliozzi, Bull. Soc. Chim. Fr. *1960*, 911.
[12] S. Weinmann, Pastille de bromure de potassium. Appareil PEC 13.
[13] S. Bergström et O. Wintersteiner, J. biol. Chem. *141*, 597 (1941); *143*, 503 (1942); *145*, 509 (1942).
[14] T. F. Gallagher, J. clin. Endocrinol. Metab. *18*, 937 (1958).
[15] D. K. Fukushima, T. F. Gallagher, W. Greenberg et O. H. Pearson, J. clin. Endocrinol. Metab. *20*, 1234 (1960).

permis de le purifier suffisamment pour obtenir un spectre IR interprétable avec sécurité.

Le Tableau rapporte les résultats obtenus chez six patientes. Dans un cas de tumeur maligne surrénalienne, nous avons identifié avec certitude le sulfate de 7-oxo-DHEA dans la tumeur. Il était aussi vraisemblablement présent dans les deux autres tumeurs (identification par une chromatographie). Les trois autres malades sont atteintes de virilisme. Chez des femmes normales, avec des prises d'essai de plasma du même ordre de grandeur, nous n'avons pas détecté de S-7-oxo-DHEA.

Composés de référence. La 7-oxo-DHEA a été obtenu à partir de son acétate (F = 183–185°)[8] par saponification par la potasse dans le t-butanol. Cet acétate provenait de l'oxydation de l'acétate de DHEA par le chromate de potassium en milieu anhydride acétique-acide acétique[9]. Le spectre IR de la 7-oxo-DHEA était conforme à celui de DOBRINER et al.[10].

Le S-7-oxo-DHEA a été préparé par la technique de l'un de nous[11]. Son spectre IR est publié ci-contre (Fig.)[12].



Ester-sulfate de 7-oxo-DHEA (Na)

7-oxo-DHEA: F = 232–235°
théorique C% 75,47 H% 8,66 pour $C_{19}H_{26}O_3$
trouvé C% 75,93 H% 8,80

S-7-oxo-DHEA (sel de sodium): F = 162-165°
théorique C% 51,57 H% 6,55 pour $C_{19}H_{25}O_6SNa,2H_2O$
trouvé C% 52,10 H% 6,40

Commentaires. L'isolement du S-7-oxo-DHEA pose le problème de son origine. En premier lieu, la 7-oxo-DHEA ne semble pas un artefact d'oxydation[13]; en effet, il n'y a pas de parallélisme quantitatif entre la DHEA et la 7-oxo-DHEA aussi bien dans les résultats rapportés ici que dans nos mesures urinaires; de plus, l'amphénone et le SU-4885 font varier à l'inverse les deux stéroïdes dans les urines[14,15].

L'isolement de la 7-oxo-DHEA dans le sang d'une tumeur surrénalienne et dans le tissu tumoral lui-même peut indiquer, confirmant l'opinion de GALLAGHER[14], la biosynthèse surrénalienne de la 7-oxo-DHEA. Pourtant, après administration de DHEA par voie orale ou intramusculaire à des adultes et enfants normaux, nous avons isolé de la 7-oxo-DHEA dans les urines, ce qui tend à en faire un produit du métabolisme de la DHEA. En réalité, peut-être la surrénale partage-t-elle avec d'autres parenchymes la capacité d'oxyder la DHEA sur le carbone 7.

Signalons que dans aucun des milieux étudiés, nous n'avons trouvé de 7-oxo-DHEA libre ou glucuro-conjuguée; nous l'avons toujours isolée directement à l'état de sulfate ou après une solvolyse par l'acétate d'éthyle[7].

Summary. The isolation of the ester-sulfate of 5-androstene 3β-ol 7,17-dione is described. This sulfate has been found in the peripheral venous blood plasma of several virilized women. Moreover, it has been isolated in 3 adrenal tumors and in the adrenal venous plasma of one of them.

E. E. BAULIEU, R. EMILIOZZI et C. CORPECHOT

Laboratoire d'Endocrinologie, Chimie Médicale, Faculté de Médecine, Paris (France), le 12 décembre 1960.

Studies on Cation Transport in Cold-Stored Human Erythrocytes. I. Effect of Aldosterone on Sodium and Potassium Transfer

An increase of the sodium content of the erythrocytes has recently been demonstrated by one of us[1-3] in several diseases with oedema, in essential hypertension and in one case of primary hyperaldosteronism. This increase has been confirmed, in the oedematous states, by RIECKER and BUBNOFF[4].

Since all these diseases are characterized by an increased secretion of aldosterone, a direct effect of the hormone on cation transport through the membrane of erythrocytes could explain the increased sodium content of the cells in these conditions.

A direct action of desoxycorticosterone (DOC) on cation transport in cold-stored erythrocytes has already been demonstrated by SHERWOOD JONES[5,6]: the hormone blocked the Na and the water output from human red cells incubated at 37°C after 6 days of cold storage.

Further experiments with aldosterone *in vitro* were carried out more recently. SULSER and WILBRANDT[7] found that aldosterone (10^{-7} g/cm^3) has not measurable effect on sodium and potassium transfer through the membrane of cold-stored human erythrocytes incubated at 37°C. On the contrary, FRIEDMAN and FRIEDMAN[8] have been able to block with aldosterone (10^{-7} g in 5 cm^3) the Na output which takes place in human red cells incubated at 37°C after 2–24 h of cold storage.

The experiments described in this paper were carried out to study if aldosterone modifies the cation transport in human cold-stored erythrocytes incubated at 37°C.

Blood from human subjects was drawn, stored and handled as previously described[9]. After 6 days of cold storage, eight 5 ml aliquots of each sample of blood were incubated in a Dubnoff shaker at 37°C, moving at the rate of 50 oscillations/min to avoid sedimentation of red cells. Aldosterone racemate ($10\,\gamma$ in 0.1 ml of ethanol) was added to 4 of the 8 samples before incubation; only 0.1 ml of ethanol was added to the remaining samples. Sodium and potassium were measured in the plasma with a Beckman DU flame photometer before and after incubation; sodium output and potassium uptake by the cells was calculated by difference, according to the method of KAHN and ACHESON[10]. The volume of cells was measured by means of hematocrit determinations before and after incubation, in duplicate.

The Table shows that erythrocytes removed measurable quantities of potassium from the incubation medium and lost measurable quantities of sodium in the same medium during incubation. Aldosterone had no measurable effect ($P > 0.05$) on these changes under the conditions of the experiment.

[1] G. D'AMICO, Amer. J. Med. Sci. *236*, 156 (1958).
[2] G. D'AMICO and M. BOSISIO, in print.
[3] G. D'AMICO and M. BOSISIO, in print.
[4] G. RIECKER, M. v. BUBNOFF, Klin. Wschr. *36*, 556 (1958).
[5] E. SHERWOOD JONES, Nature *176*, 269 (1955).
[6] E. SHERWOOD JONES, Exper. *14*, 72 (1958).
[7] F. SULSER and W. WILBRANDT, Helv. physiol. Acta *15*, C37 (1957).
[8] S. M. FRIEDMAN and C. L. FRIEDMAN, Exper. *14*, 452 (1958).
[9] G. D'AMICO and P. P. FOÀ, Exper. *15*, 144 (1959).
[10] J. B. KAHN Jr. and G. H. ACHESON, J. Pharmacol. exp. Therap. *115*, 305 (1955).
[11] D. H. P. STREETEN and A. K. SOLOMON, J. gen. Physiol. *37*, 643 (1954).
[12] K. R. KOCZOREK, J. KARL, G. RIECHER, M. EICKE, and H. P. WOLFF, Dtsch. med. Wschr. *84*, 1134 (1959).

Effect of aldosterone on cation transport through the membrane of cold-stored human erythrocytes incubated for 3 h at 37°C

Δ Na (mEq/l of cells ± S.D.[a])		P[b]	Δ K (mEq/l of cells ± S.D.[a])		P[b]
Control	Aldosterone		Control	Aldosterone	
−15.80 (±0.50)	−17.90 (±3.56)	> 0.05	+2.60 (±0.10)	+2.25 (±0.85)	> 0.05
−4.75 (±0.65)	−5.30 (±1.42)	> 0.05	+1.08 (±0.32)	+0.33 (±0.17)	> 0.05
−8.05 (±1.35)	−9.07 (±0.56)	> 0.05	+3.70 (±0.10)	+3.79 (±0.18)	> 0.05

[a] Standard Deviation.
[b] Significance of the difference of cell cation concentration changes in samples incubated with or without aldosterone (Student's 't' test).

However, the lack of an *in vitro* action of aldosterone on cation transport in cold-stored erythrocytes is not sufficient evidence against a direct action *in vivo* as a possible cause of the increased sodium content of human red cells in the diseases with increased blood levels of the hormone. (See following paper II.)

A different effect of adrenal steroids *in vivo* and *in vitro* on the cation content of erythrocytes has been already described[6,11].

STREETEN and SOLOMON[11] found that ACTH and cortisone, administered intravenously in man, produced an increase of the K erythrocyte content, whereas no measurable effect was noted by adding the same hormonal agents during the *in vitro* incubation of the cells. SHERWOOD JONES[6] showed that the *in vitro* changes produced by DOC glucoside on human red cell erythrocytes are at variance with the erythrocytic changes induced *in vivo* by the administration of large doses of DOC acetate to rats.

An increase of the sodium content of red cells has recently been reported[12] after administration of aldosterone to a patient with Addison's disease.

Riassunto. L'aldosterone non esercita alcun effetto sugli scambi attivi di Na e di K che si manifestano *in vitro* attraverso la membrana di eritrociti umani incubati a 37°C dopo 6 giorni di conservazione a 4°C.

II. Effect of a Steroidal Antagonist of Aldosterone (SC 9420) on Sodium and Potassium Transfer

Several investigators showed that cardiac glycosides and related steroids with lactone rings completely inhibit the active phase of cation transport through the membrane of human erythrocytes, both *in vitro*[7,9,10,13,14] and *in vivo*[15]. This effect has recently been referred to a direct action of the drugs on the specific enzymes which control cation transport in the red cell[16,17].

GANTENBEIN et al.[18] demonstrated that strophanthidin acts as an antagonist to desoxycorticosterone acetate (DCA) on sodium reabsorption mechanism in the renal tubule: they think that cardiac glycosides may have a competitive action with aldosterone-like steroids for a crucial locus of action within the body cells (acting on the enzymatic mechanisms which control active cation transport through the cell membranes). A similar mechanism has been postulated by the same investigators[7] to explain the effect of aldosterone on the changes induced by strophanthidin in cold-stored erythrocytes *in vitro:* the hormone can antagonize the strophanthidin-induced inhibition of cation exchanges through the membrane of cold-stored human red cells during incubation at 37°C, re-establishing a partial flux of Na from the cells and of K to the cells.

Effect of SC 9420 and Ouabain on cation transport through the membrane of cold-stored human erythrocytes for 3 h at 37°C

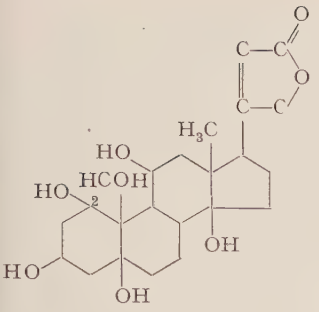
Δ Na (mEq/l of cells ± S.D.[a])		P[b]	Δ K (mEq/l of cells ± S.D.[a])		P[b]
Control	SC 9420		Control	SC 9420	
−22.8 (±3.15)	−21.4 (±0.82)	> 0.05	+2.25 (±0.54)	+2.40 (±0.30)	> 0.05
−26.0 (±1.20)	−25.7 (±1.92)	> 0.05	+8.20 (±0.10)	+8.40 (±0.11)	> 0.05
−11.1 (±0.10)	−5.0 (±1.06)	> 0.05	+6.70 (±0.24)	+6.77 (±0.29)	> 0.05
−9.2 (±2.03)	−7.4 (±0.88)	> 0.05	+5.22 (±0.21)	+5.27 (±0.30)	> 0.05
	Ouabain			Ouabain	
[c] −10.55 (±1.07)	−0.38 (±1.04)	< 0.01	+5.83 (±0.40)	−2.19 (±0.98)	< 0.01

[a] S.D. = Standard Deviation.
[b] Significance of the difference of cell cation concentration changes in samples incubated with and without SC 9420 or Ouabain (Student's 't' test).
[c] Average of 5 experiments.

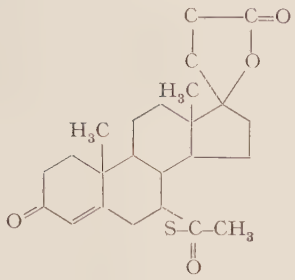
Using the same method previously described[19], we studied the effect of a steroid with a lactone ring, recently synthesized, SC 9420 or Spironolactone[20], on cation transport in cold-stored human erythrocytes incubated for 3 h at 37°C. As the Figure shows, this drug, which acts as antagonist to the sodium-retaining action of aldosterone, competing for a crucial locus of action within the renal tubular cells[21–23], has a structure which, besides being similar to that of aldosterone, is also similar to that of ouabagenin and related steroids with lactone rings studied by KAHN[14] as inhibitors of cation transport in cold-stored erythrocytes. Therefore, it is suggested that steroidal antagonists of aldosterone can affect cation transport through the membrane of body cells with a mechanism of competition with aldosterone-like steroids for a crucial locus of action within the cells, such as that postulated by SULSER and WILBRANDT[7] for cardiac glycosides.

Blood from human subjects was drawn, stored and handled as previously described[9,19]. SC 9420 was added to one half of the aliquots, before incubation, at a con-

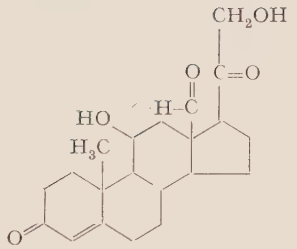
[13] H. J. SCHATZMANN, Helv. physiol. Acta *11*, 346 (1953).
[14] J. B. KAHN Jr., J. Pharmacol. exp. Therap. *121*, 234 (1957).
[15] G. CAVAGNA and G. GIUSTINA, Gazz. sanitaria *30*, 1 (1958).
[16] E. GERLACH, A. FLECKENSTEIN, and K. J. FREUNDT, Pflügers Arch. ges. Physiol. *263*, 682 (1957).
[17] H. A. KUNZ and F. SULSER, Exper. *13*, 365 (1957).
[18] R. GANTENBEIN, F. SULSER, and W. WILBRANDT, Helv. physiol. Acta *15*, C64 (1957).
[19] G. D'AMICO and A. CESANA, preceding paper I.
[20] 'Aldactone', Searle.
[21] C. M. KAGAWA, J. A. CELLA, and C. G. VAN ARMAN, Science *126*, 3281 (1957).
[22] J. A. CELLA and C. M. KAGAWA, J. Amer. chem. Soc. *79*, 4808 (1957).
[23] G. W. LIDDLE, Arch. int. Med. *102*, 998 (1958).



Ouabagenin



SC 9420 (Aldactone)



Aldosterone (Aldehyde form)

centration (3×10^{-3} *M* in 0.1 ml of ethanol) similar to that used for the steroids with lactone rings, which KAHN and ACHESON found to be active on cation transport in their experiments in cold-stored erythrocytes[10]. The same amount of pure ethanol was added to the control aliquots. Ouabain was added at the concentration of 2.5×10^{-5} g in 0.1 cm³ of distilled water; the same amount of pure water was added to the control samples.

The quantities of potassium removed from the incubation medium and the quantities of sodium set free in the same medium during incubation are shown in the Table. SC 9420 had no measurable effect on these changes under the conditions of the experiment. On the contrary, Ouabain blocked potassium uptake by, and sodium output from, incubated cold-stored human erythrocytes.

Our experiments do not support the assumption that steroidal antagonists of aldosterone compete with aldosterone-like hormones for the enzymatic mechanism which controls cation transport not only within the renal tubular cells, but also within the blood red cells and possibly within the body cells in general.

Riassunto. Nonostante l'affinità strutturale con l'uabaina, lo spirolattone antialdosteronico SC 9420 non esercita la stessa azione del glicoside cardiocinetico sugli scambi attivi che si manifestano *in vitro* attraverso la membrana di eritrociti umani incubati a 37°C dopo 6 giorni di conservazione a 4°C. Non trova quindi conferma sperimentale l'ipotesi che entrambe queste sostanze competano con l'aldosterone in qualche fase del processo enzimatico di trasporto degli elettroliti a livello di tutte le membrane cellulari dell'organismo.

G. D'AMICO and A. CESANA

Istituto di Clinica Medica dell'Università di Milano (Italia), November 30, 1960.

On the Mechanism of Action of Some 4-Aminoanalogues of Folic Acid

The biochemical mechanism of action of the antileukemic active 4-amino-analogues of folic acid, aminopterin and amethopterin has been found to be in a strong inhibition of the folic acid hydrogenases[1–6]. In this way, the formation of the coenzymatically active tetrahydrofolic acid may be prevented and therefore the biosynthesis of thymidylate and purines inhibited. In order to prepare less toxic antimetabolites of folic acid with another mechanism of action, some 4-amino-analogues of coenzymatically active folic acid derivates have been prepared in our laboratory[7]. This paper presents the inhibiting action of these substances on some enzyme systems converting folic acid into coenzymatically active single carbon carriers. Besides the folic acid hydrogenases, the serine-aldolase[8] and the hydroxymethyltetrahydrofolic acid dehydrogenase[9,10] from pigeon liver were studied as the hydroxymethylation coenzyme generating systems. From the enzymes participating in the formation of formylation coenzymes, the ATP-activated formylase of tetrahydrofolate[11], using formate as the formyl source, the formiminotransferase and deaminase, described recently by TABOR and WYNGARDEN[12], and the aerobic formylase[13] were examined. The enzyme system leucovorin-cyclodehydrase[14] converting leucovorin into its coenzymatically active imidazoline-derivate was included in the enzymes studied. Table I shows the inhibitory properties of several 4-amino-analogues of folic acid on the above-mentioned enzyme systems achieved from acetone powders of mammalian and avian liver in a partially purified form.

The inhibiting power of the 4-amino-analogues mentioned could be observed neither on the aerobic formylase of folic acid nor on the tetrahydrofolic acid formylase using formate as the formyl donor with the inhibitor concentrations equimolecular to the substrate concentration. The most strongly inhibited enzyme systems are the folic acid hydrogenases which are inhibited by 8.6×10^{-9} *M* aminopterin, or 6.2×10^{-9} *M* amethopterin. The substitution of the nitrogen atom N^{10} by the formyl or hydroxymethyl group, and the hydrogenation of the pyrazine ring, diminish the inhibition activity more than 10–100 times.

Of the enzymes formylating the tetrahydrofolate, the system formiminotransferase + cyclodeaminase only was inhibited by all 4-amino-analogues tested, but only concentrations 10^{-4} *M* caused the 50% inhibition of the enzymes. As tested by the Lineveawer-Burk test, the

[1] R. L. BLAKLEY, Biochem. J. *58*, 448 (1954).
[2] S. FUTTERMAN, Chem. Zentr. *35*, 9810 (1958).
[3] S. F. ZAKRZEWSKI and C. A. NICHOL, Biochim. biophys. Acta *27*, 425 (1958).
[4] G. R. GREENBERG, Fed. Proc. *13*, 745 (1954).
[5] J. M. PETERS and D. M. GREENBERG, Nature *81*, 1669 (1958).
[6] M. J. OSBORN and F. M. HUENNEKENS, J. biol. Chem. *233*, 969 (1958).
[7] K. SLAVÍK, V. SLAVÍKOVÁ, and Z. KOLMAN, Coll. Czech. Chem. Commun. *25*, 1929 (1960).
[8] M. J. OSBORN and F. M. HUENNEKENS, Biochim. biophys. Acta *26*, 646 (1957).
[9] R. L. BLAKLEY, Biochem. J. *61*, 315 (1955).
[10] Y. HATEFI, M. J. OSBORN, L. D. KAY, and F. M. HUENNEKENS, J. biol. Chem. *227*, 637 (1957).
[11] G. R. GREENBERG, L. JAENICKE, and M. SILVERMAN, Biochim. biophys. Acta *17*, 589 (1955).
[12] H. TABOR and L. WYNGARDEN, J. biol. Chem. *234*, 1830 (1959).
[13] K. SLAVÍK and V. MATOULKOVÁ, Coll. Czech. Chem. Commun. *19*, 1032 (1954).
[14] J. M. PETERS and D. M. GREENBERG, J. biol. Chem. *226*, 329 (1957).

Tab. I. The inhibition of some enzyme systems converting folic acid into coenzymatically active derivates by 4-aminoanalogues of folic acid metabolites

Enzyme	Leucovorin cyclodehydrase			Folic acid reductase + dihydrofolic acid reductase		
Method of activity determination	ΔE at 342 mμ in the incubation mixture (an imidazoline derivate of tetrahydrofolate)			Determination of diazotable amine after decomposition of tetrahydrofolate formed with acid		
Antimetabolite	1[a]	2	3	1	2	3
Aminopterin	no inhibition at $0.5 \cdot 10^{-3}$ *M*			$8.6 \cdot 10^{-9}$	0.0038	0.000016
N^{10}-Formylaminopterin	no inhibition at $0.5 \cdot 10^{-3}$ *M*			$3.5 \cdot 10^{-8}$	0.0167	0.0000724
N^{10}-Formyltetrahydroaminopterin				$4.3 \cdot 10^{-7}$	0.19	0.00082
N^{5}-Formyltetrahydroaminopterin	$4.3 \cdot 10^{-4}$	202.0	0.76	$1.2 \cdot 10^{-5}$	2.3	0.01
Tetrahydroaminopterin	$1.43 \cdot 10^{-3}$	634.0	2.38	$1.0 \cdot 10^{-6}$	0.46	0.002
N^{5-10}-Methylentetrahydroaminopterin	$1.0 \cdot 10^{-3}$	477.0	1.78	$4.5 \cdot 10^{-7}$	0.202	0.00088
N^{10}-Hydroxymethylaminopterin				$1.19 \cdot 10^{-6}$	0.526	0.0023
N^{10}-Hydroxymethyltetrahydroaminopterin				$7.6 \cdot 10^{-8}$	0.338	0.00146
Trihydroxymethyltetrahydroaminopterin	no inhibition at $0.5 \cdot 10^{-3}$ *M*			$2.0 \cdot 10^{-6}$	0.885	0.00325
N^{10}-Methylaminopterin	$4.6 \cdot 10^{-4}$	266.0	0.83	$6.2 \cdot 10^{-9}$	0.00275	0.0000119
N^{10}-Methyltetrahydroaminopterin	no inhibition at $0.5 \cdot 10^{-3}$ *M*					

[a] 1. Molar concentration of the inhibitor causing the 50% inhibition. 2. Absolute concentration of the inhibitor (μg/ml) causing the 50% inhibition. 3. Molar inhibitor — substrate relation.

Tab. II

Enzyme	Serine aldolase + hydroxymethyltetrahydrofolic acid dehydrogenase			Hydroxymethyltetrahydrofolic acid dehydrogenase			Formiminotransferase + cyclodeaminase		
Method of activity	ΔE at 355 mμ (anhydroleucovorin) after $HClO_4$ deproteinization								
Antimetabolite	1[a]	2	3	1	2	3	1	2	3
Aminopterin	$1.8 \cdot 10^{-4}$	79.0	0.518	$1.9 \cdot 10^{-4}$	84.2	0.549	$1.5 \cdot 10^{-4}$	67.0	0.43
N^{10}-Formylaminopterin	$3.2 \cdot 10^{-4}$	142.0	0.93	$2.3 \cdot 10^{-4}$	103.0	0.67	$2.7 \cdot 10^{-4}$	122.0	0.78
N^{10}-Formyltetrahydroaminopterin							$2.3 \cdot 10^{-4}$	104.0	0.67
N^{5}-Formyltetrahydroaminopterin	$6.9 \cdot 10^{-5}$	30.6	0.20	$1.7 \cdot 10^{-4}$	73.7	0.48	no inhibition at $0.4 \cdot 10^{-3}$ *M*		
Tetrahydroaminopterin	$3.7 \cdot 10^{-5}$	16.5	0.109	$2.2 \cdot 10^{-5}$	9.7	0.0634	$3.9 \cdot 10^{-5}$	173.0	1.106
N^{5-10}-Methylentetrahydroaminopterin	$7.3 \cdot 10^{-6}$	3.2	0.0205	$7.4 \cdot 10^{-6}$	3.3	0.0209	$8.2 \cdot 10^{-4}$	365.0	2.34
N^{10}-Hydroxymethylaminopterin							$1.86 \cdot 10^{-5}$	82.6	0.53
N^{10}-Hydroxymethyltetrahydroaminopterin	$3.14 \cdot 10^{-4}$	139.5	0.911	$8.5 \cdot 10^{-5}$	38.1	0.247	$3.62 \cdot 10^{-4}$	160.0	1.02
Trihydroxymethyltetrahydroaminopterin	$3.25 \cdot 10^{-5}$	14.1	0.094	$3.28 \cdot 10^{-5}$	14.6	0.214	$2.5 \cdot 10^{-3}$	1130.0	16 1
N^{10}-Methylaminopterin							$7.0 \cdot 10^{-4}$	312.0	2.0
N^{10}-Methyltetrahydroaminopterin							$5.85 \cdot 10^{-3}$	2600.0	16.7

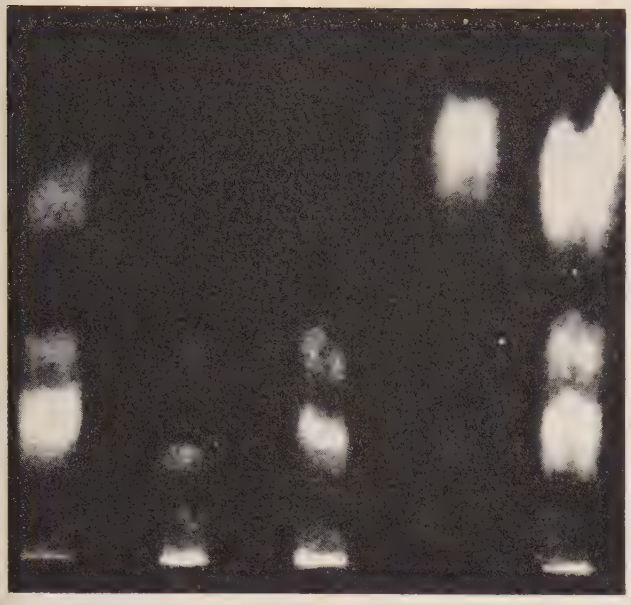
[a] 1. Molar concentration of the inhibitor causing the 50% inhibition. 2. Absolute concentration of the inhibitor (μg/ml) causing the 50% inhibition. 3. Molar inhibitor – substrate relation.

inhibition may not be of competitive nature. The enzyme leucovorin-cyclodehydrase was mostly inhibited by the structural analogue of leucovorin, but the inhibition was of the same order as in the case of the formimino-system.

As for the hydroxymethylating systems, the manometric method for the serine-aldolase determination described by BLAKLEY[8], appeared to be unsuitable for the inhibition studies. Thus, the activity of the hydroxymethyltetrahydrofolic acid dehydrogenase was determined with serine and tetrahydrofolate as substrates. The activity of both the serine-aldolase and the dehydrogenase has been determined in these experiments. For the determination of the dehydrogenase activity only, N^{5-10}-methylentetrahydrofolic acid was used as the substrate. From the comparison of the inhibition of both enzymes tested, it can be concluded that the serine-aldolase may not be inhibited by lower concentrations of the inhibitors than the dehydrogenase.

In two enzyme systems tested, it was found that the structural 4-amino-analogue of the substrate was attacked by the enzyme. The enzymic formylation of aminopterin into N^{10}-formylaminopterin[15] was described earlier. In the course of the studies on the serine-aldolase, the conversion

[15] K. SLAVÍK, H. TOMÁŠOVÁ, and V. SLAVÍKOVÁ, Coll. Czech. Chem. Commun. *23*, 1387 (1958).



The chromatogram of the incubation mixture of serine aldolase from pigeon liver with tetrahydroaminopterin (0.5% sodium carbonate, ascending technique).
Samples: 1. serine aldolase + tetrahydroaminopterin + serine. 2. sample without enzyme. 3. sample without serine. 4. synthetic N^{5-10}-methylentetrahydroaminopterin. 5. the mixture of sample 1. with the synthetic N^{5-10}-methylentetrahydroaminopterin.
Zones: a) light-green fluorescent decomposition product of tetrahydroaminopterin, probably 2,4,6-triaminopteridine. b) tetrahydroaminopterin. c) N^{5-10}-methylentetrahydroaminopterin.

of tetrahydroaminopterin into N^{5-10}-methylentetrahydroaminopterin was detected by means of paper chromatography of the reaction mixtures. The product showed identical behaviour with that prepared by the non-enzymic hydroxymethylation of tetrahydroaminopterin by low concentrations of formaldehyde. However, the dehydrogenation of the substance mentioned to the N^{5-10}-methylen-tetrahydroaminopterin could not be observed. From the results presented here, it can be supposed that from the enzyme systems of folic acid turnover the hydrogenases are most strongly inhibited by the 4-amino-analogues of folic acid derivates. Even the hydrogenated and N^5 or N^{10} substituted 4-amino-analogues, which are much less active than aminopterin or amethopterin themselves, show the strongest activity on the folic acid hydrogenases. However, in the case of the last-mentioned substances, the inhibition of the hydroxymethyltetrahydrofolic acid dehydrogenase should be considered.

The results of the toxicity determination of the above-mentioned 4-amino-analogues for mice[16] do not agree with the enzyme inhibition observed. Thus another mechanism of action might be supposed; i.e., the interference with the natural folic acid coenzymes in the single carbon transfer reactions. The inhibition of the thymidylate synthetase and the glycinaminoribotide and aminoimidazolcarboxamide ribotide transformylases will be reported later.

Zusammenfassung. Der Einfluss einiger 4-Aminoanalogen der coenzymatisch aktiven Folsäurederivate auf die Enzyme der Folsäureumwandlungen wurde verfolgt. Die stärkste Hemmung zeigen alle 4-Aminoanaloge auf die Hydrogenase der Folsäure, wobei die Hydrierung des Pyrazinringes dieselbe deutlich vermindert. Eine mässige, jedoch deutlich schwächere Hemmung von nonkompetitiver Natur wurde bei der Hydroxymethyltetrahydrofolsäuredehydrogenase, Formiminotransferase und Leukovorincyclodehydrase festgestellt. Weiter wurde die enzymatische Hydroxymethylierung von Tetrahydroaminopterin durch Serinaldolase aus der Taubenleber beobachtet.

VÉRA SLAVÍKOVÁ and K. SLAVÍK

Institute of Hematology and Laboratory of Protein Metabolism, Charles' University (Prague), 8. November 1960.

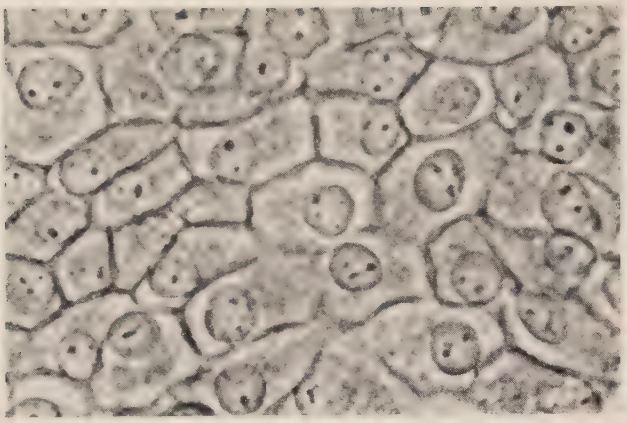
[16] K. MOTYČKA and J. ŠOCHMAN, in press.

Establishment of an Epithelial Cell Strain from Calf Liver in Continuous Culture

Calf liver cells were isolated in September 1958 for various researches in the following way. Fetal calf liver was minced and the fragments were explanted on glass without plasma in a culture medium containing 25% calf serum and 0.5% lactalbumine hydrolysate (N.B.C.) in Hanks balanced salt solution[1]. The cultures were incubated at 37°C. Media were changed every 2–3 days. Subcultures were made after about a month by trypsinizing (0.5% trypsin in a salt solution deficient in Ca^{++} and Mg^{++}). In the beginning growth of the cells was slow, but after the 5th subculture (March 1959) the growth was more regular, quicker and clearly epithelial as a close packed pavement epithelium. Cells from various explants were kept in culture. In the early stages most explants often formed epithelial cells, but after prolonged culture the cells were fibroblastlike. One of the subcultures however grows as a sheet of cells on the glass wall. After establishment of these cells in continuous culture the serum percentage of the medium was reduced gradually to 5%. The doubling time for this strain is two to three days and the mitotic index 2–3%. The shape of the cells from this strain (KaLe) is polygonal (see Fig.). The mean nuclear size, measured in a culture fixed with formol-alcohol-aceticacid and stained with iron hematoxylin, is 16 μ. (The mean nuclear size of liver tissue fixed and stained on the same manner is 7 μ.) There are some 'giants', 6–7%, whose nuclear size varies from 23–42 μ. The number of nucleoli per nucleus varies from 1–7. There is no relation between number of nucleoli and size of the nucleus. The number of chromosomes is 70 ± 2 (normal fetal liver cells 60). The cells on the photograph were fixed and stained with 2% $AgNO_3$[2]. Between the cells a 'cement substance' is clearly visible, which is stained by the silver. (Cultures of cartilage cells, stained with $AgNO_3$, never gave staining of such 'cement substance' although some aneuploid strains grow as epithelial sheets as well.) The mitochondria of the liver cells are mostly spherical, some are filamentous. The plasma of the liver cells fixed with alcohol 70% and stained with the PAS reaction is clearly PAS positive. Physiologically they are thus liver cells. Up to now it was impossible to cultivate this KaLe strain as separate cells in suspension. We tried it with shake and stir cultures, but always groups of cells were found. It is probable that the cells are held together by the cement substance. Biochemical research on this strain will be published elsewhere.

[1] J. PAUL, *Cell and Tissue Culture* (E. and S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London 1959).

[2] B. ROMEIS, *Mikroskopische Technik*, 15th Ed. (R. Oldenbourg, München 1948).



Cells from Ka Le strain magn. 450 × fix. col. $AgNO_3$. Phase contrast.

Zusammenfassung. Die Isolierung einer Zell-Linie aus fötaler Kalbsleber wird beschrieben. Die Zellen wachsen in epithelialer Schicht und sind durch Kittsubstanz miteinander verklebt. Nach der fünfzigsten Passage scheinen noch immer spezifische Leberenzyme anwesend zu sein, so dass die Zell-Linie morphologisch und biochemisch als Leberepithel betrachtet werden kann.

ANNA C. M. PIECK and CH. M. A. KUYPER

Laboratory of Cytochemistry of the R. C. University, Nijmegen (The Netherlands), November 18, 1960.

Physical Stress and Emetine Cardiotoxicity

In our previous papers we have reported the toxic patterns and the electrocardiographic changes observed in rabbits subjected to emetine acute intoxication[1], in guinea pigs subjected to emetine subacute intoxication[2], and in guinea pigs receiving courses of emetine chronic treatment similar to those used in human therapy[3]. A case of Wolff-Parkinson-White syndrome was observed in one guinea pig during such a course of treatment[4]. Degenerative and necrotic changes have been found in the myocardium of guinea pigs subjected to emetine subacute poisoning[5]. Emetine has shown inhibitory effects on the frog isolated heart[6], on the guinea pig isolated atria[7] and upon the respiration *in vitro* of guinea pig heart homogenates[8]. From these studies we have concluded that emetine is a drug with specific cardiotoxicity. This conclusion, beside having obvious repercussions in human therapy, provides also a useful basis for producing a pathological condition of the experimental animal heart which may be used in evaluating the cardiac effects of various drugs. So far we have studied the protective effect of fifteen drugs on the mortality, toxic patterns and EKG changes shown by guinea pigs during emetine subacute poisoning. Such an effect was not shown by methionine[2], γ-thyomethyl-α-hydroxybutyric acid[2], potassium chloride[9], diphosphopyridine-nucleotide[10–12], pyridoxine[13], inositol[13], adenosine-triphosphate[11,12], lipoid retina extract[6] or lipoid brain extract[6].

Protection was shown, however, by rybo-flavin-phosphate[11,12], pyridoxine-phosphate[11,12], cocarboxylase[11,12], lipoid diencephalon extract[6], lipoid heart extract[6] and embryonic heart extract[11,12], in increasing order of potency. The negative findings on the protective effect of methionine and γ-thyomethil-α-hydroxybutyric acid were confirmed by our histological studies[5]. Lipoid heart extract also showed its protective effect against emetine cardiotoxicity on the frog isolated heart[6], as did cocarboxylase on the guinea pig isolated atria[7] and embryonic heart extract on the respiration *in vitro* of guinea pig heart homogenates[8]. Emetine subacute poisoning may be useful also in the experimental study of the cardiac effects of various factors, such as physical and psychological stress. In the present paper we report the results of our research on the interactions between emetine cardiotoxicity and swimming exercise[14].

Three groups of guinea pigs were used. One group received 5 mg of emetine/kg/day, subcutaneously[2]. The second group was subjected to swimming exercise without emetine. The third group was subjected to swimming and emetine. In the second group the duration of the daily swimming sessions was 10 min on the first two days, 30 min from the third to the sixth day and 60 min from the seventh to the sixteenth day, as the animals' swimming ability increased. In the third group, from the eleventh day onwards the swimming sessions were followed by the daily injections of emetine (5 mg/kg/s.c., as in the first group). As a first consequence of emetine toxicity, the swimming ability decreased progressively in the third group. Guinea pigs swam in an ordinary bath tub. Water temperature was maintained constant at 30°C. The results are shown in Table I and II.

The combination of heart weight increase and EKG signs of Right Ventricular Strain with compensatory bradycardia, shown by the animals receiving swimming without emetine, is due to the cardiac hypertrophy already described in the rat subjected to swimming[15,16].

The typical effects of emetine subacute poisoning, such as loss of body weight, diarrhea, depression of spontaneous behaviour and EKG changes, appeared earlier and were more pronounced in the animals receiving swimming and emetine than in those receiving only emetine. The former survived a remarkably shorter time than the latter. Moreover, the third group showed EKG signs of coronary insufficiency.

1 A. MARINO and A. ROBERTACCIO, Folia cardiolog. *16*, 91 (1957).
2 A. MARINO, A. BIANCHI, A. ROBERTACCIO, and E. MIELE, Rass. med. sper. *5*, 77 (1958).
3 A. MARINO, A. ROBERTACCIO, A. BIANCHI, and E. MIELE, Acta med. Ital. Mal. inf. parass. *13*, 85 (1958).
4 A. MARINO, A. ROBERTACCIO, E. MIELE, and U. MURARO, Rass. int. Clin. Terap. *38*, 625 (1958).
5 A. BIANCHI, G. CATELLANI, A. MARINO, and M. SANSONE, Quad. Anat. Prat. *16*, 1 (1960).
6 A. MARINO, L. SORRENTINO, and M. SANSONE, to be published.
7 L. SORRENTINO, E. RUSSO, and A. MARINO, to be published.
8 A. MARINO and S. MAGLIULO, to be published.
9 A. MARINO, A. ROBERTACCIO, and E. MIELE, Rass. int. Clin. Terap. *38*, 1013 (1958).
10 A. MARINO, A. ROBERTACCIO, U. MURARO, and E. MIELE, Folia Med. *42*, 564 (1959).
11 A. MARINO, A. ROBERTACCIO, and E. MIELE, Arch. ital. Sci. farmacol. *9*, 174 (1959).
12 A. MARINO, A. ROBERTACCIO, and E. MIELE, Rass. int. Clin. Terap. *39*, 385 (1959).
13 A. MARINO and E. MIELE, Boll. Soc. ital. Biol. sper. *35*, 749 (1959).
14 This research was performed in the Institute of Pharmacology and Toxicology of the University of Naples, Italy, in collaboration with Dr. E. Russo and was communicated to the Soc. ital. Biol. sper. Naples, June 30, 1959, and to the Fall meeting of the Amer. Soc. for Pharmac. exp. Therap., Seattle, Washington, Aug. 21–25, 1960. The Author wishes to thank the 'Sandoz Pharmaceutical' for emetine hydrochloride used in the studies.
15 G. KUSCHINSKY, Klin. Wschr. *24*, 468 (1947).
16 E. GRANDJEAN, Schweiz. Med. Wschr. *80*, 203 (1950).

Tab. I

Experimental group	Animals no. used	Animals no. dead	Survival time in h (mean)	Heart weight (mean) mg	Heart weight (mean) mg/100 of body weight	EKG Sequential changes
1. Emetine	4	4	120	1200	240	Depressed or inverted T – Tachycardia – PR prolongation – QRS widening – Bradycardia – Blocks
2. Swimming	4	0	—	1550	323	Bradycardia – Right ventricular strain
3. Swimming + emetine	4	4	60[a]	1950	375	Coronary T – PR prolongation – QRS widening – Bradycardia – Blocks

[a] Test indicates that survival times of groups 1 and 3 differ significantly at 0.01 level.

Tab. II. Percentage of animals showing EKG changes

EKG changes	Treatment	Hours of emetine treatment 30	58	90	118
T	E	75	100	100	100
	E+S	100	100	D	D
ST	E	25	50	50	50
	E+S	75	75	D	D
T coronary	E	0	0	0	0
	E+S	75	75	D	D
Tachycardia	E	50	0	0	0
	E+S	0	0	D	D
Bradycardia	E	0	0	75	100
	E+S	75	100	D	D
PR prolongation	E	0	50	75	75
	E+S	100	100	D	D
QRS widening	E	0	25	50	75
	E+S	75	100	D	D
Blocks	E	0	0	0	75
	E+S	0	75	D	D
Deaths	E	0	0	25	100
	E+S	0	75	100	100

E = Emetine alone
E+S = Emetine and swimming

The T changes, sometimes accompanied by ST depression, are typical of subacute emetine poisoning, as we have observed them in more than 200 guinea pigs so treated in our previous research. They have been attributed to a generalized myocardial damage caused by emetine, which, in the terminal stages of treatment, spreads to the conduction tissue, determining the changes of intra- and atrioventricular conduction mentioned in Table I and II. In the present and previous research we never observed EKG signs of coronary insufficiency in guinea pigs receiving only emetine. This negative datum was observed not only in guinea pigs subjected to emetine subacute poisoning, but also in those subjected to emetine chronic treatment, in rabbits receiving emetine acute poisoning and recently in dogs[17] receiving intracoronary or intravenous injections of the drug, in which the coronary flow or the coronary debt was controlled together with the EKG and blood pressure. The EKG signs of coronary insufficiency, however, were evident in the group of animals subjected to swimming and emetine. This may be dependent upon the fact that the heart hypertrophy by exercise would require more nutrition of the myocardium not realizable because of myocardial damage caused by emetine. Finally, the increase of spontaneous behaviour depression by emetine, shown by the third group, confirms the myocardial origin of the emetine depression as we have suggested in other research[18], in which emetine did not show any effect on the conditioning, while the cardiac effects and the spontaneous behaviour depression were evident.

From the present studies we would conclude that: 1. swimming exercise causes very strong potentiation of emetine cardiotoxicity; 2. there are mutual interactions between EKG changes by emetine and EKG changes by swimming exercise; 3. swimming exercise evokes the appearance of coronary signs never observed with emetine alone; 4. the combination of swimming exercise and emetine subacute poisoning may form a basis for pharmacological production of experimental coronary insufficiency; 5. this combination may also serve as a model for the experimental study of the clinical problem of the interactions between physical stress and coronary disease.

Résumé. Nous rapportons ici des expériences sur le cobaye se rapportant à la toxicité de l'émétine pour le cœur, en particulier après potentialisations par de exercices de nage.

A. Marino

Istituto di Farmacologia e di Tossicologia, Università di Napoli (Italy), September 30, 1960.

[17] A. Bianchi and A. Marino, to be published.
[18] A. Marino, Science, in press.

Psychological Stress and Emetine Cardiotoxicity

The influence exerted by mental and especially emotional factors on the symptoms, course and prognosis of cardiac disease, is an observation as old as medicine. Very often, as also in our personal experience[1], emotional stress played the role of precipitating factor in the pathogenesis of the myocardium infarction and other cardiac diseases[1]. More recently, a direct role played by brain mechanisms in the origin of coronary disease was also suggested and supported by clinical and statistical evaluations[2]. Increase in

[1] A. Robertaccio and A. Marino, Rass. int. Clin. Terap. *45*, 1775 (1958). – M. Mattioli, *L'Infarto del Miocardio* (E.S.I., Naples 1955). – E. Lepeschkin, *Modern Electrocardiography* (Williams & Wilkins Co., Baltimore 1951), Vol. 1.
[2] N. E. Ischlondsky, *Brain Mechanisms in Coronary Disease* (Henry Kimpton, London 1952).

serum cholesterol levels and decrease in serum phospholipid levels were recently reported in students under examination stress, in an attempt to study relationship between emotional stress, cholesterol-lipid-lipoprotein metabolism and coronary arteriosclerosis[3]. However, up till now, there has not been definitive experimental evidence of an association between cardiac disease and psychological factors. At present, there are two major experimental approaches to this problem. One approach is the study of the cardiovascular repercussions following ablation or stimulation of certain areas of the central nervous system, expecially of those which are supposed to have a role in the elaboration and regulation of emotions[4]. The second approach is the study of the cardiac reactions to experimental procedures, such as emotional stress, conditioning and conflict situations[5]. Since PAVLOV first demonstrated conditioned reflexes, cardiac and vascular conditioned responses have been investigated, particularly in the U. S. A.[5]. However, with both of these approaches, the peripheral responses to the neurological or psychological artificial conditions were elicited by a normal heart in basal condition or subjected to spontaneous physiological exertions. A third approach, in our view, may be attempted by producing a pathological condition of the heart and then evaluating the cardiac influences of psychological stress. In this way, the experimental approach may be closer to the clinical observation, which does admit a cardiac predisposition in the cases of psychogenic cardiac diseases, in order to explain the selective choice by the psychological factor of the heart as the organ involved. We have thought that emetine could be used in order to produce this predisposition in the experimental animal, since in our previous research[6] this drug has been shown to be a specific cardiotoxic agent. Emetine subacute poisoning has provided a useful method for producing a pathological condition of the heart of the guinea pig, which is similar to the interstitial myocarditis of human pathology and may be used in evaluating the cardiac effects of drugs and other factors[6]. Therefore, in the present research[7], the interactions between emetine cardiotoxicity and psychological stress have been investigated in the guinea pig.

Three groups of guinea pigs were used. *One group (controls) received only emetine.* The animals were given 5 mg of emetine hydrochloride/kg of body weight/day, subcutaneously, as described in our previous papers[6]. The treatment was continued until the death of the animals. *The second group was subjected to conditioning and emetine.* These animals were previously conditioned to an avoidance situation, according to the method described by MOWRER in the rat[8]. The unconditioned stimulus was a mild electroshock. The conditioned stimulus was a combination of a steady light and a noise. The animals were conditioned to avoid the shock by crossing a barrier from a lighted into a dark compartment of the experimental cage. They reached the maximum percentage of positive responses, i.e., Conditioned Avoidance (C.A.), between 7 and 11 training sessions, each session being comprised of 20 presentations of the conditioned stimulus. After this maximum had been maintained for more than three sequential sessions, the emetine treatment was begun and continued until the death of the animals, as described before, while the animals were regularly subjected to the daily training sessions. In our previous research emetine itself did not show any influence on the conditioning[6]. During the period in which the animals were subjected only to the conditioning, neither loss of body weight nor any adverse symptoms were observed. EKG records, performed 15 min after the training sessions, showed only a slight tachycardia. *The third group was subjected to conflict and emetine.* These animals were previously conditioned to the avoidance situation, as were the animals of the second group. They reached the maximum C.A. between 5 and 25 training sessions. After this maximum had been maintained for more than three consecutive sessions, the animals were forced into the conflict situation by alternating the training sessions with sessions in which the punishing stimulus was given even when the conditioned response was correctly performed. As a consequence of this procedure, a progressive reduction of C.A. resulted, together with typical symptoms of anxiety and tachycardia. No other significant EKG changes or reduction of body weight were observed during this period. When the

Fig. 1. Guinea pig, previously conditioned to the avoidance situation, then forced into the conflict situation and subjected to the emetine subacute poisoning. C.A. = Conditioned Avoidance or percentage of positive responses for each training session. The continuous lines indicate normal sessions, the broken lines the sessions in which the punishing stimulus was given even when the conditioned response was correctly performed.

[3] P. T. WERTLAKE, The New Physician *1*, 42 (1959).

[4] J. M. FURSTER and S. J. WEINBERG, Exper. Neurol. *2*, 26 (1960). A. D. KELLER, Physiol. Rev. *40*, 116 (1960). R. F. RUSHMER et al., Physiol. Rev. *39*, 41 (1959); *40*, 27, 136 (1960). J. M. R. DELGADO, Physiol. Rev. *40*, 146 (1960); National Academy of Sciences, Nat. Res. Counc., Symposium on the Central Nervous System Control of Cardiovascular System, Washington, D.C., November 1–3 (1959).

[5] D. M. BIKOV, *The Cerebral Cortex and the Internal Organs* (Translated and edited by W. H. GANTT, Chem. Publ., New York 1957). – W. H. GANTT, Amer. J. Psych. *98*, 4 (1942); Tr. Amer. Neurol. A. *72*, 166 (1946); the Pharmacologist *2*, 63 (1960). – R. A. DIKMAN and W. H. GANTT, Amer. J. Psychol. *6*, 263 (1951). – J. M. NOTTERMAN, W. N. SCHOENFELD, and P. J. BERSH, J. comp. Physiol. Psychol. *45*, 1 (1952); Science *115*, 77 (1952). – O. WEININGER, Science *119*, 285 (1954).

[6] For the references on our studies on *Emetine Cardiotoxicity*, see our previous paper on this Journal *17*, 116 (1961).

[7] This study was performed in the Lab. of Neuropharmacology, Dept. of Anatomy, University of California Medical Center at Los Angeles, during the period spent there by the author, on a Riker Fellowship, 1959–1960, through the International Union of Pharmacologists. The author wishes to thank the Department of Anatomy for the facilities generously provided, Dr. A. J. HANCE for his help and 'Horton & Converse, Los Angeles' for the Emetine used in this study. Part of the research was communicated to the Fall Meeting of the Amer. Soc. for Pharmacol. and exp. Therap., Seattle, Washington, Aug. 21–25 (1960).

[8] O. H. MOWRER, J. exp. Psychol. *27*, 497 (1940).

Experiment group	No. animals	Hours of emetine treatment and percentage of deaths 72 84 96 108 120 132 144 156 168 180 192	Survival time mean in h	σ_m	t	P	% change	Body weight % change at 5th day (mean)
E	11	0 0 9 9 27 36 63 63 72 72 100	144.6	± 9.4	—	—	—	−21.5
Condit. + E	6	0 0 0 33 66 66 66 66 66 100	131.0	± 12.9	0.6	0.05	− 9	−23.0
Conflict + E	9	0 11 11 88 88 100	102.2	± 3.1	3.74	< 0.01 > 0.001	−30	−26.0

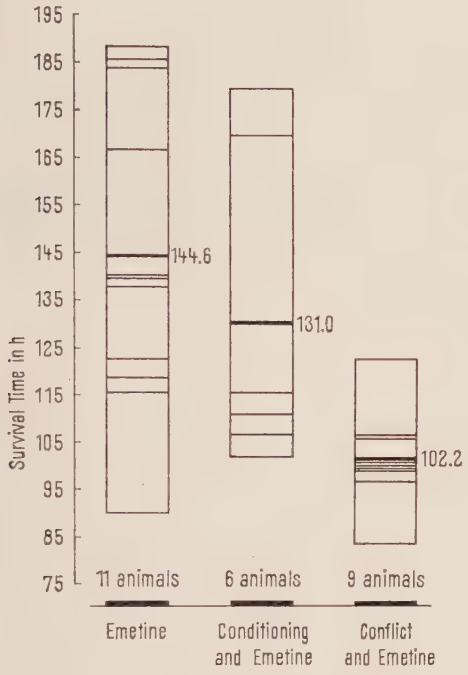


Fig. 2. Survival times in h after the beginning of emetine subacute poisoning. The heavy lines indicate the means of each group, the thin lines represent the individual values. Note the following: 1. the animals receiving emetine and conflict (third group) died remarkably earlier than the animals receiving emetine alone (first group) and those receiving emetine and conditioning (second group); 2. the maximum survival time in the third group is less than the means of the second and first one; 3. the survival times of the guinea pigs of the third group are closely concentrated around the mean, as compared to those of the other two groups, in which the individual values are more dispersed.

conflict had developed, the emetine treatment was begun and continued until the death of the animals, as described before. During the treatment, the animals were regularly subjected to the conflict sessions. In Figure 1 the behaviour of a typical animal of the third group is reported.

Comparisons of the survival times, percentage of deaths and body weight reduction in the three groups of animals are tabulated in Figure 2 and the Table.

The typical EKG changes associated with the emetine treatment, as described in our previous papers[6], appeared earlier and were more pronounced in the third group than in the second and in the first one. Also, from the comparison between the survival time after emetine and the conflict behaviour of each individual guinea pig of the third group, it would seem that there was a correlation between intensity of conflict and degree of mortality in the animals subjected to both conflict and emetine.

On the basis of these results, we would conclude that: 1. conditioning alone causes only a slight and non-significant potentiation of emetine cardiotoxicity; 2. conflict exerts an evident and significant potentiation of emetine cardiotoxicity; 3. since the conflict is a specific kind of psychological stress and, on the other hand, emetine has toxic effect specifically on the heart, the combination of psychological and pharmacological methods we have used in the present research, may form a basis for the experimental study of the association between psychological factors and cardiac disease.

While there is no question about the validity of these results, there is ambiguity about their cause. Thus, we do not know how the conflict potentiates the cardiotoxicity of emetine. It is supposed that emotions are able to cause changes in the visceral functions, as a result of their disturbing action on the autonomic or hormonal balance of the organism. In particular, a state of sympathicotonia and a release of hormones, such as adrenaline, cortisone or ACTH, have been suggested in the interpretation of these changes[2–5]. Therefore, the observed phenomenon could be connected with an interaction between the effect of these neurovegetative factors or hormones and the effect of emetine on the heart. In this way, it could be included in the patterns of the general adaptation syndrome according to SELYE[9], supposing conflict to play the role of the stressing factor and emetine that of the cardiac vector. Alternatively, the conflict may be supposed to activate the higher brain mechanisms suggested by ISCHLONDSKY[2] in the interpretation of the pathogenesis of some cardiac disease, in which case the brain mechanism could find an easy receptor in the heart damaged by emetine. These and other hypotheses are possible and further research is necessary to clarify the results reported above.

Riassunto. L'autore riporta i risultati di alcune ricerche sulle interferenze fra cardiotossicità dell'emetina, condizionamento e conflitto nella cavia. Il conditionamento esercita un lieve e non significativo potenziamento sulla cardiotossicità emetinica, mentre tale potenziamento è risultato evidente ed altamente significativo con il conflitto. I risultati vengono discussi e l'associazione di metodiche farmacologica e psicologica, usata nelle presenti ricerche, viene proposta come base di lavoro sperimentale per lo studio delle interferenze fra stress emotivi e cardiopatie.

A. MARINO[10]

Laboratory of Neuropharmacology, Department of Anatomy, University of California Medical Center at Los Angeles (California), September 29, 1960.

[9] H. SELYE, *The Chemical Prevention of Cardiac Necroses* (The Ronald Press Co., New York 1958); *The Stress of Life* (McGraw-Hill Book Co., New York 1957); Postgraduate Med. *25*, 600 (1959); Angiology *10*, 412 (1959).

[10] Present address: *Istituto di Farmacologia e di Tossicologia, Università di Napoli (Italy).*

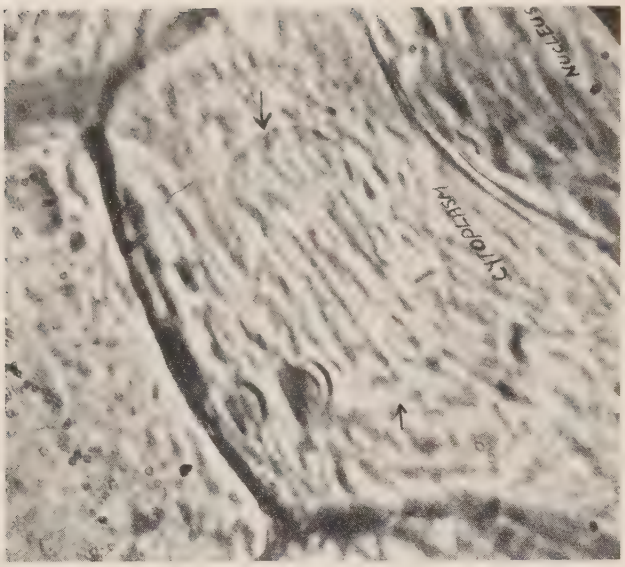


Fig. 1. A portion of oocyte of *N. chrysoleucas*, photomicrographed under phase-contrast microscope, showing 'yolk nucleus'.

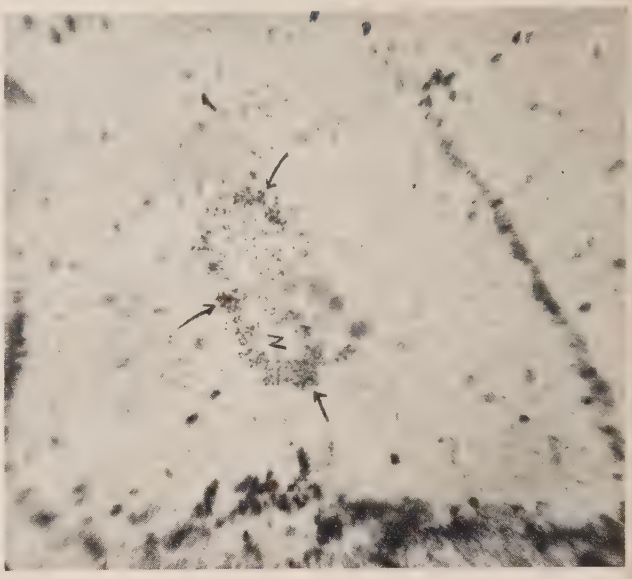


Fig. 2. An early oocyte photomicrographed to show the incorporation of tritium labelled cytidine in the nucleoli.

Autoradiographic Studies of Yolk Nucleus in Fish Oocytes

Since the early days of cytology there had been extensive studies on the extrusion of nucleolar material into the cytoplasm, which is described as a well known phenomenon of 'yolk nucleus' in fish oocytes. Cunningham[1] and Wallace[2] were the earliest workers to describe 'yolk nucleus' in the fish oocytes which according to them arises in relation with the germinal vesicle or nucleus and later moves towards the periphery of the egg. They speculated the probability of some sort of relationship of this body with the formation of oil in the egg cell; thus named it as 'yolk nucleus'. Wheeler[3], Narain[4], and Subramaniam[5] have also reported the nuclear origin of the so-called 'yolk nucleus'. Recent studies of Sathyanesan[6] and Stolk[7], based on classical histological technique such as picroformol-acetic/haematoxylin, describe this structure as an intranuclear body, larger than a normal nucleolus and with varying staining intensity, which pierces through the nuclear membrane to migrate into the cytoplasm where it merges into the surrounding cytoplasmic inclusions.

My present histo- and cytochemical studies by the use of autoradiographic technique help to clarify the origin of 'yolk nucleus' which seems to have been misleading a great many cytologists due to their exclusive use of biological stains, then considered to be specific, but recent advances in cytochemical techniques have revealed that identity of staining reaction by no means implies identical substances.

The appearance of a similar structure, corresponding to 'yolk nucleus', has already been reported by me in fishes *Ophiocephalus punctatus*[8] and *Barbus ticto*[9], and has also been studied in *Labeo dyocheilus* (unpublished). As earlier reported this structure is noticed as a mere circular concentration of mitochondria and Golgi granules; sometimes small vacuoles or tiny vesicles may also be observed. Such a locus can be clearly observed under phase-contrast microscope (as photomicrographed in Fig. 1) in the oocyte of the fish, *Notemigonus chrysoleucas*. My present studies have revealed that this structure has no relationship with nucleolar extrusions.

The various histochemical tests show that in very early oocytes this body 'the so-called yolk nucleus' appears as a juxta-nuclear concentration of mitochondrial granules among which a large number of bigger granules with stronger sudanophil nature are formed. A few sudanophobe vacuoles or vesicles may also be seen appearing in this area. The fine mitochondrial granules show protein contents with certain lipo-protein traces; while the sudanophil bigger granules consist exclusively of phospholipids, as revealed by Baker's acid haematin technique. In the late oocytes this body seems to merge into the surrounding cytoplasmic inclusions.

Further investigations whether the 'yolk nucleus' represents a nucleolus emerged from the nucleus of the oocyte were supplemented by the use of autoradiographic technique in which tritium labelled cytidine was used to follow the extrusion of nucleolar RNA. The oocytes of the fish, *Notemigonus chrysoleucas*, were incubated in the isotope solution (10 μcurie in 2 ml of Ringer's solution) for 12, 24, and 36 h at room temperature. The grains produced on the autoradiographic film showed that there is optimum uptake of labelled cytidine by the RNA of the nucleoli of early oocytes in 24 h (Fig. 2); and that at no stage a nucleolus is seen passing out into the cytoplasm in its complete form. However, it may be probable that some nucleolar material passes out into the cytoplasm in the diffused state, as shown by the fact that nucleoli always plaster against the nuclear membrane in late

[1] J. T. Cunningham, Quart. J. Micro. Sci. *40*, 101 (1897).
[2] W. Wallace, Quart. J. Micro. Sci. *47*, 161 (1903).
[3] J. F. G. Wheeler, Quart. J. Micro. Sci. *68*, 641 (1924).
[4] D. Narain, Proc. Nat. Acad. Sci. India *21*, 75 (1951).
[5] M. K. Subramaniam, J. Roy. Micro. Soc. *55*, 12 (1935).
[6] A. G. Sathyanesan, Naturwiss. *46*, 92 (1959).
[7] A. Stolk, Nature *184*, 1746 (1959).
[8] H. C. Chopra, Quart. J. Micro. Sci. *99*, 149 (1958).
[9] H. C. Chopra, Res. Bull. Panjab Univ. India *152*, 211 (1958).
[10] V. Nath, B. Singh, and A. Bakr, Proc. Nat. Inst. Sci. India *10*, 247 (1944).
[11] I wish to thank Dr. D. J. Fluke and Dr. H. S. Roberts for the supply of autoradiographic material.
[12] Present address: Division of Cell Biology, Institute for Muscle Diseases, 515 East, 71 Street, New York.

oocytes and seem to lose their certain parts. Also the cytoplasmic RNA is feebly labelled as may be revealed by very few grains in the cytoplasm.

The conclusion of early workers with regard to the nucleolar origin of 'yolk nucleus' fails to be confirmed by my present investigations, and I fully agree with NATH's et al.[10] view advocating that the nucleolar extrusions in fish oocytes are artefacts; and such a conclusion derived by earlier workers from the irregularity of nuclear membrane (sometimes rupturing also) having nuclear pouches is erroneous and may be the effect of fixation and the mechanical disturbance.

Résumé. L'expulsion de la matière nucléolaire dans les œufs du poisson est étudiée ici par autoradiographie. Employant la cytidine-H_3, nous avons vu que le RNA nucléolaire passe dans le cytoplasme sous forme diffuse, et non comme un nucléole complet appelé «noyau-jaune».

H. C. CHOPRA[11,12]

Hargitt Research Fellow, Duke University, Durham (N.C.), November 11, 1960.

Temperature and Mutant Expression

The uniform adaptive phenotypic reactions to environmental change performed by populations of wild-type organisms are thought to be originated by natural selection. Out of a heterogeneous population, with individuals reacting in various directions, only those genotypes showing a useful reaction would be preserved.

There is support for this idea in the fact that wild populations do not react uniformly to such unnatural variations in environment as provided by temperature shock, X-rays and various chemicals (review GOLDSCHMIDT[1]). Moreover, by artificial selection for a special type of reactivity to such abnormal conditions in *Drosophila*, BATEMAN[2] obtained stocks showing predominantly the reaction selected. On this basis one might expect that in an experimental situation, where a mutant gene is introduced in an otherwise wild genotype, a given change in environment would not result in a uniformly directed reaction of the mutant expression. However, in the many experiments done on the reactivity to temperature change of mutant expression in *Drosophila melanogaster*, only uniform reactions were reported. They were in fact described as a property of the mutant gene. We mention the work of ZELENY and his group (a.o. HERSH[3]) on Bar, STANLEY[4], HARNLEY[5] and RIEDEL[6] on vestigial and STERN[7] and HOUSE[8] on cubitus-interruptus. In those experiments, mostly inbred laboratory stocks were used to ensure a uniform response, since the main interest lay in the precise quantitative relations between temperature and mutant expression. These relations were expected to yield information about the nature of gene action (PLUNKETT[9]).

In contrast, for the experiments reported here, the mutant ci^D (cubitus-interruptus dominant) was crossed into three recently caught wild stocks from Colmar (France, courtesy of Prof. H. BURLA, Zürich), Leiden, and Gouda (Netherlands) in such a way that together with ci^D only chromosomes 4 and Y were introduced, amounting to about 0.2% of the total genetic map. As ci^D is homozygous lethal it was in all cases balanced over another 4th chromosome lethal, sparkling-Cataract (spa^{Cat}, abbreviated below as Cat).

The ci^D mutant shows among other features a terminal interruption of the 4th longitudinal wing vein. The expression of ci^D was measured as the percentage ratio of the length of the 4th to that of the 3rd longitudinal vein distal to the anterior crossvein (a/b in Fig. 1). All cultures were set up with 10 cm^3 of a constant food medium (2% agar, 15% sugar, 4% dead dried yeast, 0.1% nipagin) and with a constant population density of 100 larvae. All larvae had been reared at 25° up to 48 $\pm$ $1^1/_2$ h of age. In each culture the left wings of 20 ♀♀ and 20 ♂♂ were measured.

In the first experiment, the three stocks were compared at temperatures 20° and 25°. The results in Table I show clearly that the shift in expression of ci^D is directed differently. The Leiden stock shows a direct relation between temperature and mean expression, the Colmar stock no change and the Gouda stock an inverse relation.

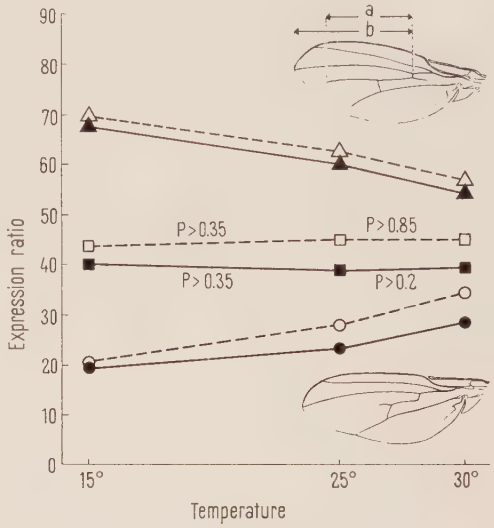


Fig. 1. The mean expression ratio at 3 different temperatures of the Colmar ci^D/Cat base population (□ ■) and the lines selected for high (△ ▲) and low (○ ●) expression ratio. Open figures and broken lines represent females, solid figures and lines the males. The differences between the samples were tested following Wilcoxon and probabilities exceeding 0.001 are given in the Figure. The means of the high line are based on 40, all other means on 60 individuals.

Tab. I. The mean expression ratio of ci^D in 3 different wild stocks at different temperatures. From the Gouda stock for each mean only 40 individuals were measured, the other means are based on 60 individuals. *P* values are calculated after Wilcoxon.

Stock			Mean expression ratio 25°	Mean expression ratio 20°	Difference 25°–20°	*P*
Gouda	ci^D/Cat	♀	52.3	56.6	−4.3	<0.001
		♂	46.6	50.4	−4.2	<0.001
Colmar	ci^D/Cat	♀	49.1	48.0	−1.1	>0.4
		♂	40.5	39.8	+0.7	>0.14
Leiden	ci^D/Cat	♀	43.7	34.7	+9	<0.001
		♂	32.2	29.3	+2.9	<0.001

[1] R. B. GOLDSCHMIDT, Physiological Genetics (New York 1938).
[2] K. G. BATEMAN, J. Genet. *56*, 443 (1960).
[3] A. H. HERSH, J. exp. Zool. *57*, 283 (1930).
[4] W. F. STANLEY, Phys. Zool. *4*, 394 (1931).
[5] M. H. HARNLEY, Genetics *21*, 84 (1936).
[6] H. RIEDEL, Arch. entw. Mech. *132*, 463 (1935).
[7] C. STERN, Genetics *28*, 441 (1943).
[8] V. HOUSE, Genetics *40*, 576 (1955).
[9] C. R. PLUNKETT, J. exp. Zool. *46*, 181 (1926).

Further experiments were done with the Colmar ci^D/Cat stock (no change in mean) and two stocks obtained from it by selecting for 6 generations for respectively high and low expression ratio at 25°. Three cultures each of the base population and the 'low' line and two cultures of the 'high' line were reared at 15°, 25° and 30° (Fig. 1). The mean expression of the low line has a direct relation with the change of temperature and the mean expression of the high line an inverse relation. The frequency distributions (Fig. 2) reveal that each selection line reacts uniformly in one direction. The mean of the base population does not change significantly with the change in temperature. However, the frequency distributions suggest an increase in the variation at lower temperatures on either side of the mean, resulting in significantly higher variances at lower temperatures (Tab. II). This can only mean that the Colmar ci^D/Cat base population is heterogeneous and consists of individuals reacting to a change of temperature in different directions. Selection for high or low expression ratio at 25° separates the genotypes with different reaction norms.

Our results demonstrate that the conclusion of HOUSE[7], that 'ci^D ... shows a linear increase in L-4 interruption with increasing temperature' has no general validity. The direction of temperature response is not determined by the properties of the ci^D gene. The reaction is governed by the whole developmental system of wing venation including the influence of the ci^D gene. Therefore it is completely dependent on the genetic background.

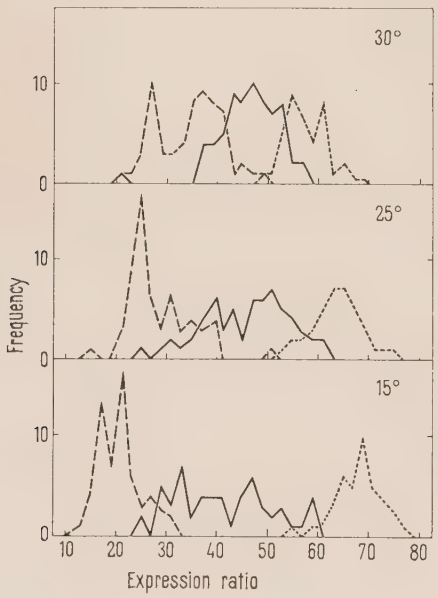


Fig. 2. Frequency distributions at 3 different temperatures of the Colmar ci^D/Cat base population (solid lines) and the lines selected for low (broken line) and high (stippled lines) expression ratios. Only the distributions of ♀♀ are given.

Tab. II. Variances of the Colmar ci^D/Cat base population at 3 different temperatures. The variances are pooled from 3 cultures, and P was calculated following Bartlet's test.

	Variances			P for homogeneity
	30°	25°	15°	
♀	30.1	59.3	113.6	< 0.001
♂	27.3	60.5	87.0	< 0.001

The question arises whether this conclusion has general validity. Only after performing the experiments, did I find that KAMSHILOW[10], as early as 1939, had published some experiments done with the same theoretical background, which seem to have been overlooked. Using the phenotypic expression of the *Drosophila* mutant eyeless as influenced by humidity of the culture media, he succeeded in selecting for a change in direction of the phenotypic reaction. Moreover KAMSHILOW[10] in eyeless, and recently WADDINGTON[11] in several other mutants, found that selection can change the quantitative relationship between temperature and expression.

The results reported here indicate that temperature experiments on morphological mutant traits have no more value in elucidating gene action than experiments on any normal morphological character. Environment acts on a development system arising as an integrated result of a complex interplay of many genetic factors. This kind of experiment can only tell something about the properties of such systems as a whole. In addition, these experiments provide a clear demonstration of interaction between genotype and environment in the sense in which this term is used in quantitative genetics (ROBERTSON[12]).

Zusammenfassung. Durch Versuche mit der Mutante ci^D von Drosophila wurde nachgewiesen, dass die temperaturabhängigen Veränderungen in der Ausprägungsweise ausschliesslich durch den Restgenotypus bestimmt werden. Diese Feststellung hat Bedeutung für Genphysiologie, Evolution und quantitative Vererbung.

W. SCHARLOO[13]

Genetisch Laboratorium Leiden (The Netherlands), December 22, 1960.

[10] M. M. KAMSHILOW, C. R. Acad. Sci. URSS *23*, 302 (1939).
[11] C. H. WADDINGTON, Genetical Research *1*, 140 (1960).
[12] F. W. ROBERTSON, Genetical Research *1*, 288 (1960).
[13] I should like to thank Prof. H. GLOOR for his critical interest and Prof. H. R. VAN DER VAART of the Instituut voor Theoretische Biologie, Leiden, for advice in statistical matters.

Action of Reserpine on the Submicroscopic Morphology of the Pineal Gland[1]

In a previous paper[2], it was demonstrated that the main morphological characteristic of the *pinealocyte*, the parenchymal cell of the pineal gland, is represented by club-shaped perivascular expansions connected to the cell edge by thin pedicles. These expansions contain mitochondria and two types of vesicles: one having an homogeneous light content and the other an heterogeneous one, with a central osmium deposit (Fig. 1). The mean diameter of the two types of vesicles is of 410 Å while the dense granules have a mean diameter of 210 Å. The existence of a single distribution curve for the two types of vesicles was considered as an indication that there may be intermediary forms between them (Fig. 3). The name *plurivesicular secretory processes* was proposed for these cellular expansions emphasizing their probable function in the pineal gland.

[1] This research has been supported by the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas of Argentina and Grant B 1549 of the National Institutes of Health, United States Health Service.
[2] E. DE ROBERTIS and A. PELLEGRINO DE IRALDI, sent for publication.

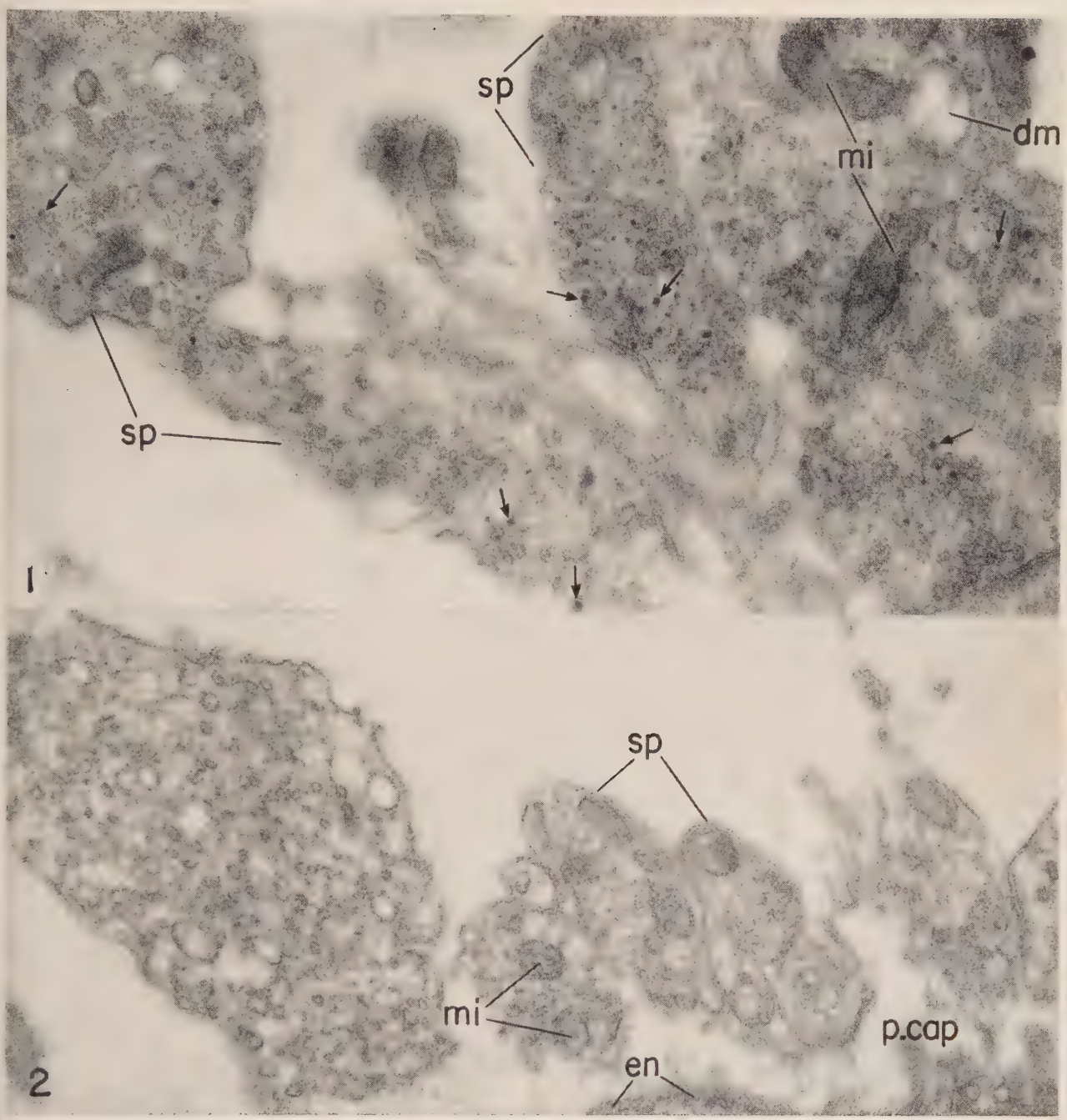


Fig. 1. Electronmicrograph of several plurivesicular secretory processes of the pineal gland (*sp*) of a normal control rat. Numerous vesicles with light homogeneous content and others with a dark osmium granule (arrows) make the main content of the process. There are also mitochondria (*mi*), some of them showing degeneration (*dm*). ×48000.

Fig. 2. Same as Figure 1; 2 h after injection of reserpine. See the disappearance of all the heterogeneous vesicles and the reduction of size of the vesicular material. *en* = endothelium, *p.cap.* = pericapillary space, *sp* = secretory process. ×48000.

The findings of GIARMAN and DAY[3] of an exceptionally high concentration of catecholamines and serotonin, and of LERNER et al.[4] of the N-acetyl-5-methoxytryptamine —the pineal hormone called *melatonin*—and the fact that some of the biogenic amines reduce osmium tetroxide intensely[5] and can be localized with the electron microscope[6], led us to interprete tentatively the plurivesicular material as the site of storage of some of these amines. To check this hypothesis, reserpine, a substance known to produce the release of serotonin[7], norepinephrin[8] and dopamine[9] from the nerve tissue, was used.

[3] N. J. GIARMAN and M. DAY, Biochem. Pharmacol. *1*, 235 (1958).

[4] A. B. LERNER, J. D. CASE, Y. TAKAHASHI, T. H. LEE, and W. MORI, J. Amer. Chem. Soc. *80*, 2587 (1958).

[5] H. S. BENNETT, Amer. J. Anat. *61*, 333 (1941).

[6] E. DE ROBERTIS and A. VAZ FERREIRA, Exp. Cell Res. *12*, *568* (1957).

[7] P. A. SHORE, A. PLETSCHER, E. G. TOMICH, R. CARLSSON, R. KUNTZMAN, and B. B. BRODIE, Ann. N. Y. Acad. Sci. *66*, 609 (1957).

[8] A. CARLSSON, E. ROSENGREN, A. BERTLER, and J. NILSSON, in *Psychotropic Drugs* (Ed. S. Garattini and V. Ghetti, Milano 1957), p. 363.

[9] A. BERTLER and E. ROSENGREN, Exper. *15*, 10 (1959).

White rats of 1.5–3 months were injected intraperitoneally with 5 mg/kg of reserpine and sacrificed 10 min to 8 days thereafter. Another group was injected with a similar dosis during four consecutive days and the rats were sacrificed 1 h after the last injection. The preparative techniques for the electron microscope were those previously described[2].

On the electron micrographs, the morphological aspect of the plurivesicular component was studied in the treated animal and compared with that of parallel normal controls. Measurements of the diameter of the vesicles and granules and determinations of size distribution were carried out in the controls and 2 h after reserpine injection (Fig. 3). The relative proportion of homogeneous to heterogeneous vesicles was determined in a total of 500 elements for each particular experiment (Fig. 4).

It was found that reserpine produces the almost complete disappearance of heterogeneous vesicles containing dense granules between 2 and 48 h after a single injection

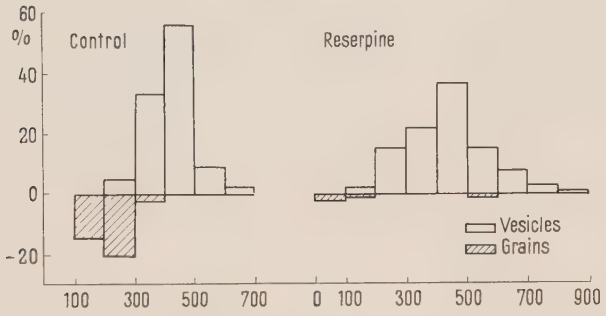


Fig. 3. Histograms of sizes of vesicles in the secretory processes of the control rat and 2 h after injection of reserpine. In the upper part distribution of sizes of 100 vesicles, below distribution of sizes of dense grains/100 vesicles. See the almost disappearance of grains with reserpine (only 22 grains in 600 vesicles).

(compare Fig. 1 and 2). There is a decrease in size of all vesicles (Fig. 3) and some of them resemble sections of the tubular elements found in the pedicle of the expansion[2]. The changes in the relative proportion of the two types of vesicles demonstrate that the drug has an action in as early as 10 min, reaching the maximal effect 2 h after the injection (Fig. 2).

The storage of dense granules was very small after 24 and 48 h increasing notably after 3 days and reaching an almost normal content after the 6th and 8th day. The curve of grain restoration is strikingly similar to that obtained by SHORE and BRODIE[10] with the recovery of serotonin and noradrenaline in the brain of rabbits after injection with reserpine (Fig. 4).

Chronic administration of reserpine leads to the almost complete disappearance of the dense granules and to other profound changes in the vesicular components of the pinealocytic expansion.

All these findings suggest that the secretory processes of the pinealocyte contain the biogenic amines and that these are localized in the plurivesicular material. The fact that reserpine produces the release of serotonin, noradrenaline and dopamine and that these amines may reduce osmium tetroxide, makes a finer morphological discrimination difficult at the present time.

Further pharmacological studies with other drugs that may influence the metabolism of biogenic amines should be carried out. The observations made so far demonstrate that the electron microscope may be a useful tool for studying the sites of storage and mechanisms of release of biogenic amines in the pineal gland.

Zusammenfassung. Pinealdrüsen von Ratten nach Reserpin-Injektion wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Die Behandlung ergab auffallende Veränderungen in den plurivaskulären Sekretionsprozessen[2]. Die dichten Bläschen verschwanden innerhalb 2–48 h nach der Reserpingabe nahezu vollständig und erschienen erst wieder zwischen dem 3. bis 8. Tag. Dieser Wechsel verläuft parallel zum Wiederauftreten von Serotonin und Noradrenalin nach SHORE und BRODIE[10].

AMANDA PELLEGRINO DE IRALDI
and E. DE ROBERTIS

Instituto de Anatomía General y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Buenos Aires (Argentine), November 15, 1960.

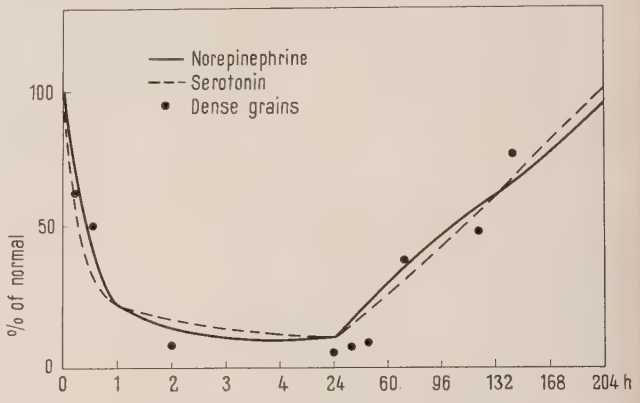


Fig. 4. Curve of SHORE and BRODIE[10] showing the concentration of serotonin and noradrenaline (in % of the normal) in the nervous tissue after a single injection of reserpine. On this curve the points indicate the % change of the normal in dense granules found in our experiments. (100% represent the number of dense grains/100 vesicles found in the normal controls).

[10] P. A. SHORE and B. B. BRODIE, in *Psychotropic Drugs* (Ed. S. Garattini and V. Ghetti, Milano 1957), p. 423.

Tryptophan, Precursor of Tropic Acid in *Datura Stramonium*

Hyoscyamine is the ester of tropine and *l*-tropic acid. Considerable work has been done on the biogenesis of this alkaloid[1]. The pyrrolidine part of tropine has been shown to derive from ornithine[2], but the origin of the residual portion of it has not yet been established[3]. Likewise, the biogenesis of the tropic acid moiety of hyoscyamine has remained in darkness.

Tropic acid – α-phenyl-β-hydroxypropionic acid – has been variously suggested to be of terpenoid origin[4] or to be formed from prephenic acid[5]. LEETE has shown re-

[1] W. O. JAMES, *The Alkaloids*, Vol. 1 (R. H. F. MANSKE and H. L. HOLMES, Academic Press Inc., N.Y. 1950), p. 64.
[2] E. LEETE, L. MARION, and J. D. SPENSER, Can. J. Chem. *32*, 1116 (1954).
[3] A. V. ROBERTSON and L. MARION, Can. J. Chem. *38*, 294 (1960).
[4] E. M. TRAUTNER, Austr. Chem. Inst. J. and Proc. *14*, 411 (1947).
[5] E. WENKERT, Exper. *15*, 165 (1959).

	Activities in counts/min (corrected for background)
Carbon dioxide	2250
Styrene fraction	17

cently[6] that phenylalanine-3-C^{14} gives rise, in *Datura Stramonium*, to α-labelled tropic acid. He considers the possibility that it is formed from prephenic acid by condensation of the latter in the β-position with formaldehyde, or its biological equivalent, followed by decarboxylation and dehydration. This pathway appears unlikely because neither C^{14}-labelled formaldehyde nor C^{14}-labelled formate was incorporated into tropic acid and it would require the reversibility of the reaction prephenic acid → phenylalanine.

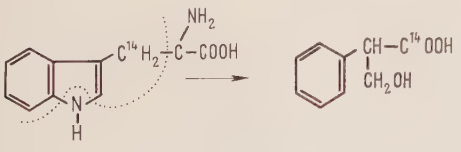
We have succeeded in showing that tryptophan acts as a direct precursor of tropic acid by loss of two terminal carbon atoms and elimination of the indole nitrogen.

On January 13, 1959, 50 μc of radiochemically pure DL-tryptophan-3-C^{14} was fed to 10 cm-tall plants of *Datura Stramonium* grown in aerated inorganic nutrient solution. Controls were run to assure complete absence of microbial conversion of the tryptophan. Absorption of tryptophan was ensured by replacing the absorbed solution with distilled water as needed. The plants were harvested on February 2, 1959, the alkaloid fraction separated and hyoscyamine isolated by the procedure of LEETE et al.[2]. The alkaloid was identified by means of its characteristic picrate salt and by co-chromatography with hyoscyamine (solvent systems: *n*-butanol, glacial acetic acid, water 4:1:1 (BAW) and water-saturated phenol).

Autoradiography showed the alkaloid to be radioactive. The hyoscyamine was eluted and hydrolyzed for 15 min with *N* 1 sodium hydroxide solution, the resulting tropine isolated by extraction with ether and then tropic acid with ether from the remaining acidified mixture. Both tropine and tropic acid were identified by means of chromatography (solvent systems: BAW and isopropanol, glacial acetic acid, water, 80:6:14). Autoradiograms showed that only tropic acid, not tropine was radioactive.

The radioactive tropic acid was mixed with 50 mg of tropic acid to act as a carrier, and the mixture was decarboxylated by heating with quinoline and powdered copper for 1 h at 230–235°C[7]. The evolved carbon dioxide was passed through a chilled trap, collected in *M* 1 Hyamine solution[8], and the radioactivity determined with a Packard Automatic Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer. Residual traces of tropic acid in the styrene fraction were removed by shaking an ether solution of the styrene with dilute aqueous sodium hydroxide solution.

Thus, more than 99.3% of the radioactivity of the tropic acid resides in its carboxyl group, indicating the following biogenesis:



Zusammenfassung. Verfütterung von Tryptophan-3-C^{14} an *Datura Stramonium* führt zur Bildung von radioaktiver Tropinsäure, deren gesamte Radioaktivität auf die Carboxylgruppe beschränkt ist, der zu erwartenden Stelle bei direkter Umwandlung des Tryptophans unter Verlust des Stickstoffes und der zwei endständigen Kohlenstoffatome.

A. M. GOODEVE and E. RAMSTAD[9]

Department of Biopharmacognosy, School of Pharmacy, Purdue University, Lafayette (Indiana), October 3, 1960.

[6] E. LEETE, J. Amer. chem. Soc. *82*, 612 (1960).
[7] C. WALLING and K. B. WOLFSTIRN, J. Amer. chem. Soc. *69*, 852 (1947).
[8] J. M. PASSMANN, N. S. RADIN, and J. A. D. COOPER, Anal. Chem. *28*, 484 (1956).
[9] This study was supported by grants from the Purdue Research Foundation and reported at the AAAS meeting, Chicago, December 1959.

Histochemical Observations on the Pigment Bodies of the Spinal Neurones of some Reptiles

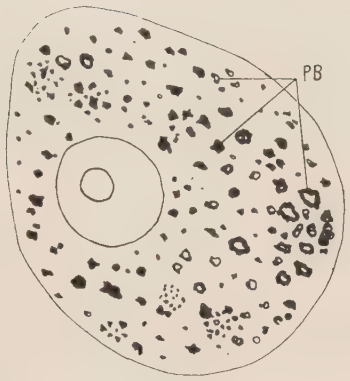
The author in collaboration with GUPTA (GUPTA and SHARMA[1]) observed the presence of a pale-yellow, diffused pigment in the untreated living spinal neurones of the frog, *Rana tigrina*, studied with phase-contrast microscopy. This pigment is responsible for the general pale hue of the ganglia and is seen to occur in one or more areas in each cell. Quite often the pigment is observed in the interna of the duplex lipid bodies also.

The neurones of some reptiles, viz. ageing wall-lizards (*Hemidactylus flaviviridis* Rüppel), adult *Uromastix hardwickii*, and young and adult water-snakes (*Natrix piscator piscator* Schneider) studied by the author in the living condition under the phase-contrast microscope and with basic dyes used supervitally reveal discrete dirty-yellow to dark-brown pigment bodies and a refractile, pale-yellow substance—the pigment— confined to certain duplex lipid bodies only. The latter was, however, not seen in any of the fixed preparations. The living neurones of the water-snakes may reveal in addition a diffused pigment in the cytoplasm like that of frog. However, the general coloration of the ganglia in these reptiles is not pale-yellow in spite of the pigment in the neurones, unlike that in frog.

The pigment bodies in the reptilian neurones under discussion are distributed at random, although occasionally they tend to aggregate. These bodies exist as spheroids, subspheroids, and particulates with irregular contours measuring approximately 1 μ to 4 μ. Some of these bodies display variously distorted binary structures as well (Fig.). Curiously enough, the cells which abound in these pigment bodies rarely contain lipid particulates.

The pigment bodies resist all the fat solvents (e.g., cold and hot acetone, cold ethanol, chloroform, ether, and hot pyridine) and react negatively to most of the dyes and colorants. Only a few of them segregate neutral red (*super vitam*) and appear somewhat dirty-red. The various tests for carotenoids, such as Car-Price reaction[2], trichloroacetic acid[2], sulphuric acid[2], hydrochloric acid[2], and formic acid[2], when applied on the living ganglia, react negatively with these bodies. Similarly, LISON's test[3] for carotenoids tried on the gelatin sections of formaldehyde-calcium[4] fixed material also yields negative results.

[1] B. L. GUPTA and S. P. SHARMA, Res. Bull. Panj. Univ. *10*, 267 (1959).
[2] A. G. E. PEARSE, *Histochemistry* (Churchill Ltd., London 1960).
[3] L. LISON, *Histochimie et cytochimie animale* (Gauthier-Villars, Paris 1953).
[4] J. R. BAKER, Quart. J. micr. Sci. *90*, 293 (1949).



Diagrammatic representation of a reptilian spinal neurone showing the general distribution, and the various sizes and shapes of the pigment bodies (PB).

In formaldehyde-calcium/gelatin and Zenker-, Helly-, Bouin/paraffin sections of the ganglia coloured with ethanolic Sudan black B[4], some pigment bodies appear fairly coloured, while others even in the same site are only partly positive. These bodies give a faint red coloration in periodic acid-Schiff[5] and methyl green/pyronin G[6], react almost negatively to Sudan IV[2], and give a strong positive reaction with chrome alum haematoxylin[7]. The performic acid-Schiff[8] gives capricious results with these bodies, while the plasmal reaction[9,10] responds negatively.

The pigment bodies are, therefore, in all probability, some lipofuscins[2].

Besides these intracellular pigment bodies heaps of brownish-black, barrel- or spindle-shaped pigment bodies also occur surrounding the entire ganglion in the sections. It is noteworthy that unlike the above-mentioned intracellular pigment bodies these bodies defy all the histochemical reactions referred above.

In author's opinion the pigment bodies described above are not the products of secretion from the classical Golgi apparatus as claimed by Moussa and Banhawy[11], since the author[12,13] has not come across any such apparatus or even a remotely comparable structure either in the living or in the processed young neurones. Thomas[14,15], Baker[16,17], Nath[18], and Malhotra[19,20], also hold identical views. The pigment bodies, on the other hand, appear to have originated as a result of partial or total oxidation of some of the lipid bodies. Lipid participation in the synthesis of pigment has also been advocated by Cohn[21].

What, however, is the significance of this oxidation resulting in the accumulation of the pigment, in the economy of neurones, is a matter of speculation at this stage.

Nayar[22] in the neurones of *Iphita limbata* Stal. (Hemiptera) considers the neurosecretory product as lipofuscins. Whether or not the above mentioned pigment bodies could be correlated with the neurosecretory product of Nayar in *I. limbata* Stal. is a matter of comprehensive investigation, but that the former bear a close histochemical relationship with the latter, inasmuch as both contain in them lipofuscins, is absolutely beyond doubt.

The refractile, pale-yellow pigment observed in the cores of certain duplex lipid bodies (*vide supra*) seems to have originated within the interna of these lipid particulates (Golgi bodies of Hirsch) in much the same way as described by Baker[4], Hirsch[23], Lacy[24,25], and Kanwar[26,27].

Résumé. Des lipofuscines, corps pigments jaune-sale à brun-sombre, ont été observées dans les neurones vivants et fixés de quelques reptiles. L'auteur y a aussi constaté la présence de corps pigmentés extracellulaires, noir-brunâtre, de nature histochimique inconnue.

Sat Parkash Sharma

Department of Zoology, Panjab University, Chandigarh (Punjab, India), December 3, 1960.

[5] R. D. Hotchkiss, Arch. Biochem. *16*, 131 (1948).
[6] B. M. Jordan and J. R. Baker, Quart. J. micr. Sci. *96*, 177 (1955).
[7] G. Gomori, Amer. J. Path. *17*, 395 (1941).
[8] R. D. Lillie, Stain. Tech. *27*, 37 (1952).
[9] A. J. Cain, Quart. J. micr. Sci. *90*, 411 (1949).
[10] E. R. Hayes, Stain. Tech. *24*, 19 (1949).
[11] T. A. Moussa and M. Banhawy, J. R. micr. Soc. *74*, 162 (1954).
[12] S. P. Sharma, Res. Bull. Panj. Univ. (N.S.), *11*, 183 (1960).
[13] S. P. Sharma, Res. Bull. Panj. Univ., in press.
[14] O. L. Thomas, Quart. J. micr. Sci. *89*, 333 (1948).
[15] O. L. Thomas, J. comp. Neurol. *95*, 73 (1951).
[16] J. R. Baker, J. R. micr. Soc. *74*, 217 (1954).
[17] J. R. Baker, Sym. Soc. exp. Biol. *10*, 1 (1957).
[18] V. Nath, Nature *180*, 967 (1957).
[19] S. K. Malhotra, Res. Bull. Panj. Univ. (Old Series) *151*, 179 (1958).
[20] S. K. Malhotra, Quart. J. micr. Sci. *100*, 339 (1959).
[21] S. A. Cohn, J. Histochem. *3*, 342 (1955).
[22] K. K. Nayar, Biol. Bull. *108*, 296 (1955).
[23] G. C. Hirsch, Symposium on Cell Secretion (1955), p. 25.
[24] D. Lacy, J. R. micr. Soc. *73*, 179 (1953).
[25] D. Lacy, J. R. micr. Soc. *74*, 226 (1954).
[26] K. C. Kanwar, Res. Bull. Panj. Univ. *10*, 10 (1959).
[27] K. C. Kanwar, Res. Bull. Panj. Univ. *10*, 99 (1959).

The Lateral Transport of Indoleacetic Acid-C^{14} in Geotropism[1]

The concept that the upward curvature of geotropically stimulated shoots results from the directed migration of auxin to the lower side has for over 30 years been a prominent feature of the theory of the tropisms. It was Dolk[2] who, by collecting auxin in agar blocks applied to the upper and lower parts of the basal surfaces of horizontal *Avena* coleoptile sections, and assaying the blocks by the standard *Avena* test, first provided clear-cut experimental support for this idea. He found that about 62% of the transported auxin was recovered from the block in contact with the lower side and 38% from that in contact with the upper side. This was true whether the source of auxin was the coleoptile tip, still attached, or, instead, agar containing exogenous auxin applied at the apical cut surface. Some recent workers, however, have suggested that Dolk's data need reinterpretation. They have applied C^{14}-labeled indoleacetic acid (IAA) to horizontally placed plant organs and, after bisecting these organs in the horizontal plane, have been unable to find any difference in radioactivity between the two sides. The results of Bünning et al.[3], Ching and Fang[4], Reisener[5], and especially of Reisener and Simon[6] seem to show clearly that the total amount of auxin in the upper half of

[1] This work was supported by a National Science Foundation predoctoral fellowship to Barbara Gillespie and by a grant from the National Science Foundation, No. G-9084, to Professor K. V. Thimann.

[2] H. E. Dolk, *Geotropie en Groeistof*, Dissertation, Utrecht (1930); English translation by F. Dolk-Hoek and K. V. Thimann, Rec. Trav. Bot. Néerl. *33*, 509 (1936).
[3] E. Bünning, H. J. Reisener, F. Weygand, H. Simon, and J. F. Klebe, Z. Naturforschg. *11-B*, 363 (1956).
[4] T. M. Ching and S. C. Fang, Physiol. Plantarum *11*, 722 (1958).
[5] H. J. Reisener, Naturwiss. *44*, 120 (1957).
[6] H. J. Reisener and H. Simon, Z. Bot. *48*, 66 (1960).

a horizontally placed oat coleoptile or seedling root, to which exogenous auxin has been applied, is approximately the same as that in the lower half. On the other hand, DOLK's experiments were successfully repeated on *Avena* by NAVEZ and ROBINSON[7], and on other plants by DIJKMAN[8], BOYSEN-JENSEN[9] and GILLESPIE and BRIGGS[10]. In most of these cases the positive results were obtained by analyzing the agar blocks into which the auxin had diffused. Thus, experiments of this type suggest that it is auxin moving in the polar transport system which mediates the geotropic response[11]. The lateral transport hypothesis ('Cholodny-Went theory') might still be correct, therefore, for the auxin which is being actively transported, but would have to be discarded if it were proved that labeled indoleacetic acid actually carried by the polar transport system undergoes no sidewise displacement. In the present paper experiments are described which, to some extent, distinguish between transported and non-transported auxin and thus allow a direct test of this alternative.

The coleoptiles used were those of *Avena*, var. Segerhavre ('Victory oats'); the methods of purifying the carboxyl-labeled indoleacetic acid ($ICH_2C^{14}OOH$)[12], and of measuring low radioactivity both in agar blocks and in tissue were those of GOLDSMITH and THIMANN[13]. The purity of the indoleacetic acid was checked chromatographically, using 8:1:1 isopropyl alcohol : 28% ammonia : water as solvent. At least 98% of the total radioactivity of the paper chromatograph strip was associated with a single spot which contained all of the detectable Salkowski-positive compounds to be found in the solution of labeled hormone; it was checked that 2% of the Salkowski-positive material could have been detected under the chromatographic conditions employed, had it occurred elsewhere on the paper. The spot moved with the same Rf value as did a control spot of unlabeled pure indoleacetic acid.

The first series of experiments were modeled after the classical investigation of DOLK[2]. A razor blade, coated with stopcock grease, was mounted in a lucite holder. On either side of the blade, agar blocks of washed 1.5% agar were set in such a way that the cutting edge of the blade protruded 1 mm above the surface of the blocks. Next, 20 sections were prepared from *Avena* coleoptiles by removing their apical 1.5 mm and trimming them to a length of 7 mm. The sections were pressed on to the razor blade so that the basal ends were bisected in a plane perpendicular to that of the vascular bundles and rested on the agar. Finally, agar blocks containing 0.4 mg/l labeled indoleacetic acid were set on the apical ends of the coleoptile sections; these blocks were held in place by the lid of the plastic apparatus. After being placed in a small humid chamber, the assembly was set either so that the *Avena* sections were held horizontally, or else so that they were held upright as a control. After 165 min, the coleoptile sections, the 'donor' agar block, and the upper and lower (or right and left) 'receiver' agar blocks were placed in separate planchets. Unused duplicates of the 'donor' blocks were similarly treated. After drying the samples, their radioactivity was measured as described by GOLDSMITH and THIMANN[13]. The results are presented in Tables I and II. Each measurement is corrected for absorption of radiation by the agar or by the tissue in which the labeled auxin was assayed, so that the total amount of activity in each assembly may be computed and compared with the amount known to be present initially in the donor block. The correction factors for agar in Tables I and II are 1.29 and 1.36, respectively, while the correction factors for tissue are 1.84 and 1.90 respectively. The data

Tab. I. Distribution of IAA-C^{14} transported out of *vertical* coleoptile sections into receiver blocks in contact with the basal surfaces. Time of transport, 165 min; initial donor blocks contained 510 cpm[a], average

Figures represent cpm[a], corrected for self-absorption of agar or tissue

A Donor block	B Tissue	C Right receiver block	D Left receiver block	% Recovery $\left[\frac{100(A+B+C+D)}{510}\right]$	% of transported auxin in right block $\left[\frac{100\,C}{C+D}\right]$
286	172	28.6	24.2	101	56.7
288	135	26.4	27.9	94	48.6
306	135	27.4	29.4	98	48.2
306	128	27.0	32.2	97	45.7
296	151	28.5	30.6	98	48.3
305	158	23.6	24.9	101	47.8
302	123	28.2	24.8	94	53.1
322	142	28.8	22.3	101	56.3
268	127	23.6	28.8	88	45.1
303	157	30.2	24.6	101	55.0
289	136	23.2	28.4	94.0	45.0
302	151	24.5	37.8	101	39.4
Average 298	143	26.7	28.0	97	49.4

[a] Counts per min

of Table I, concerning vertical sections, show that the results obtained by this method have good consistency and that the recovery of applied radioactivity is very high. Table II shows that, after applying the same auxin concentrations to horizontal sections, there appears an asymmetry in the distribution amounting to *40.5:59.5%*. The ratio for a duplicate series similar to that in Table II, and also comprising eleven experiments, was found to be *39.1:60.9*. Six other preliminary experiments gave similar results. It will be recalled that DOLK[2] by bioassay found a ratio of 37.5:62.5. GILLESPIE and BRIGGS[10], using *Zea mays* coleoptiles, found 34.0:66.0. Thus *the isotope method confirms the bioassay*, within narrow limits.

The discrepant results reported by other workers have without exception been obtained by halving coleoptiles supplied with IAA-C^{14} and determining the radioactivity in the tissue. This procedure measures not only the IAA in transit, but also any additional IAA which is not being transported. Considerable amounts of such non-transported IAA occur at the uppermost part of the section where IAA enters also by pure diffusion; further, in this part of the section the asymmetric redistribution is only just beginning. A new group of experiments was therefore carried out in which the upper and lower halves of cole-

[7] A. E. NAVEZ and T. W. ROBINSON, J. gen. Physiol. *16*, 133 (1932).
[8] M. J. DIJKMAN, Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam *36*, 748 (1933).
[9] P. BOYSEN-JENSEN, Planta *20*, 688 (1933); Kgl. Danske Videnskab. Selskab, Biol. Med. *13*, 1 (1936).
[10] B. GILLESPIE and W. R. BRIGGS, Abstract in Proc. IX. Internat. Bot. Congress, Montreal *2*, 133 (1959); Plant Physiol. *36*, in press (1961).
[11] See discussion in WENT and THIMANN, *Phytohormones* (Macmillan, New York 1937), p. 160.
[12] We wish to express our thanks to Dr. B. B. STOWE, who worked out the method of synthesis via gramine methosulfate.
[13] M. H. GOLDSMITH and K. V. THIMANN, in preparation. We wish to thank Dr. GOLDSMITH for her cooperation and help.

Tab. II. Distribution of IAA-C^{14} transported out of *horizontal* coleoptile sections into receiver blocks in contact with the basal surfaces. Time of transport, 165 min; initial donor blocks contained 511 cpm, average

Figures represent cpm, corrected for self-absorption of agar or tissue

A Donor block	B Tissue	C Upper receiver block	D Lower receiver block	% Recovery $\left[\frac{100(A+B+C+D)}{511}\right]$	% of transported auxin in upper block $\left[\frac{100\,C}{C+D}\right]$
244	109	30.0	38.1	83	44.0
261	105	27.0	41.4	85	39.8
297	105	28.7	33.2	91	46.4
292	143	30.4	33.8	98	47.3
292	138	25.8	34.4	96	43.0
303	109	20.3	30.2	91	40.2
248	150	27.4	45.6	93	37.6
236	104	19.9	34.2	77	36.7
287	121	24.9	39.0	92	39.0
260	133	23.1	37.5	89	38.1
245	150	21.7	40.2	90	35.0
Average 269	124	25.4	37.1	90	40.5[b]

[b] Duplicate series of 11 experiments averaged 39.1%.

Tab. III. Distribution of IAA-C^{14} within upper and lower halves of horizontal coleoptile sections

Time of transport, 165 min; initial donor blocks contained 511 cpm, average

Figures represent cpm corrected for self-absorption of agar or tissue

A Donor block	B Upper tissue	C Lower tissue	D Receiver	% Recovery $\left[\frac{100(A+B+C+D)}{511}\right]$	% of tissue auxin found in upper half $\left[\frac{100\,B}{B+C}\right]$
250	61.6	70.6	61	88	47.8
316	63.5	72.8	62	101	46.6
310	58.5	77.3	67	101	43.5
284	68.3	77.8	70	99	46.7
276	70.0	72.1	62	95	49.4
296	74.9	72.6	73	102	50.7
319	70.0	66.5	61	102	51.4
296	63.6	65.4	55	95	49.3
286	68.6	68.8	64	96	50.0
296	69.9	82.7	60	101	45.4
306	58.8	71.1	53	97	45.4
Average 294	66.4	72.5	62.5	98	47.8[c]

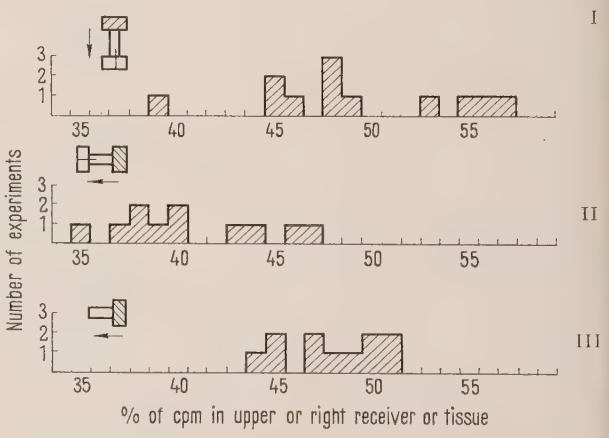
[c] Duplicate series of 6 experiments averaged 47.3%.

optile sections were distinguished by means of carefully placed spots of India ink, and after a 165-minute diffusion period, the sections were placed on the stage of a dissecting microscope in a cold room at 3°C and bisected under red light in the plane which had previously lain horizontal. When the coleoptile sections are removed from the assembly they begin to wilt, and unless frozen quickly their radioactivity begins to disappear. For this reason, the lots of halved coleoptiles were immediately placed in a freezer to await measurement of the radioactivity, without waiting to determine their weights. However, 5 other sets of coleoptile sections were bisected and weighed; the average difference between 20 upper and 20 lower halves was found to be 2.2% with a maximum difference of 5.3%, so that any variation in the precision with which the sections are bisected is not large enough to invalidate comparisons between the radioactivity of the upper and lower halves.

The results of this series are shown in Table III. The corrections were applied as before, the factors being, for agar 1.37, and for tissue 1.76. The total radioactivity found in the tissue agrees very well with that in Tables I and II. The figures do show a small difference between the amounts of auxin on the two sides, but it is barely significant.

The data of all the experiments are summarized in the Figure. It must be concluded that the geotropic response of *Avena* coleoptiles is indeed mediated by lateral redistribution of auxin.

The absence of any clear lateral redistribution in the tissue itself also agrees with the results of other workers[3–6] and the data are compatible with the accumulating body of evidence that not all the auxin present in a tissue is capable of exerting immediate physiological effects. This conclusion is indeed supported by the following simple computation. Since the rate of transport has on several occasions been shown to be 10–12 mm/h, since the rate has been found essentially constant during a 3 h diffusion period, and since the sections are 7 mm long, auxin must pass through them in about $^3/_4$ h; that is, the amount of freely-moving auxin which would be expected to be found in the tissue is that which can be transported in $^3/_4$ h. Table II (columns C and D) shows that 63 cpm are received in 165 min, which means that in $^3/_4$ h only about *23 cpm* are transported. But *124 cpm* were found in the tissue (Table II, column B). Thus some 80% of the tissue auxin found in the experiment of Table III (columns B and C) *cannot be in transit.* If much of this material does not become redistributed by gravity its presence will of course mask the influence of gravity on the transported auxin.



Summary of the experiments of Tables I, II, and III. Each small square represents one complete experiment in which the distribution of auxin between 2 blocks of agar (upper two lines) or 2 halves of the coleoptile section (lowest line) is presented as the percentage found in the upper (or right)half. *Top:* vertical coleoptile sections, % of total transported auxin found in right-hand agar block. *Middle:* horizontal coleoptile sections, % of the total transported auxin found in *upper agar block.* (A second group of eleven experiments gave almost identical results.) *Bottom:* horizontal coleoptile sections, % of the total auxin found in *upper half of coleoptile section.*

Zusammenfassung. Die Hypothese, dass eine geotropische Reizung von Hafer-Koleoptilen eine Querverschiebung des Wuchsstoffes zur Folge hat, ist mit radioaktiver β-Indolylessigsäure (Indol-$CH_2C^{14}OOH$) bestätigt worden. Das Verhältnis der aus der oberen und der unteren Flanke von Koleoptil-Zylindern mit Agarblöckchen abgefangenen Indolylessigsäure wurde gleich 40:60 gefunden.

Die Ursache dafür, dass dieser Effekt in längshalbierten Koleoptilen nicht festgestellt worden ist, liegt im grossen Anteil nicht transportierten Auxins in den Koleoptilen.

Barbara Gillespie and Kenneth V. Thimann

Harvard Biological Laboratories, Cambridge (Mass.), December 5, 1960.

Über neue chemotherapeutisch wirksame Sulfonamide

Im Rahmen von Forschungen in der Pyrimidinreihe haben wir neue 2-Sulfanilamido- bzw. 4-Sulfanilamido-5-alkoxypyrimidine und deren Hydroxy-, Methoxy-, Methylmercapto- und Methylderivate hergestellt. Bei einigen von diesen Stoffen haben wir eine ziemlich protrahierte chemotherapeutische Wirkung bei experimenteller Infektion weisser Mäuse mit *Streptococcus pyogenes* festgestellt und deshalb möchten wir über unsere Ergebnisse eine vorläufige Mitteilung veröffentlichen[1].

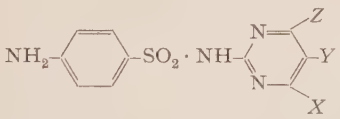
Die chemotherapeutische Wirksamkeit wurde an mit einer 1000fach letalen Dosis von *Streptococcus pyogenes* Tiere, wurde der Wert der relativen chemotherapeutischen Aktivität (R.C.A.) berechnet:

$$\text{R.C.A.} = \frac{1}{n} \cdot \left(\frac{k}{a_1} + \frac{k}{a_2} + \ldots \frac{k}{a_n} \right),$$

wo n die Zahl der Versuchstiere bedeutet, denen die geprüfte Substanz appliziert wurde; a_1, $a_2 \ldots a_n$ geben die Überlebenszeiten der einzelnen Versuchstiere an. Bei den Tieren, die den Versuch (d. h. 10 Tage) überlebt haben, setzen wir $a = \infty$ ein; k bedeutet die durchschnittliche Überlebenszeit der Kontrolltiere.

Von den Monoalkoxyderivaten der Sulfanilamidopyrimidine wiesen die grösste antibakterielle Wirksamkeit das 5-Methoxy- und 5-Äthoxy-2-sulfanilamidopyrimidin (Tab. I; Präp. I-2586, I-1013) auf. Durch Verlängerung der Alkylkette in Stellung 5 sank die antibakterielle Wirksamkeit rasch herab (I-2580, I-2581). Relativ wenig wirksam war auch die 5-Phenoxyverbindung (I-2642). Durch Eintritt einer Hydroxy- oder Methoxygruppe in Stellung 4 ging die Wirksamkeit nahezu verloren (I-2655, I-2583). Von den disubstituierten Derivaten der 2- bzw. 4-Sulfanilamidopyrimidine waren diejenigen am wirksamsten, deren alle drei Substituenten sich gegeneinander in *m*-Stellung befanden (I-890, I-1018), wie es beim 4-Sulfanilamido-2,6-dimethoxypyrimidin (Sulfadimethoxin, Madribon) der Fall ist. Die Lage der Sulfanilamidogruppe in *o*-Stellung zum 5-Methoxyl hat eine starke Verminderung der Aktivität zur Folge (Tab. II; I-2951, I-2654, I-2588). Von Trimethoxyderivaten war das 2-Sulfanilamido-4,5,6-trimethoxypyrimidin (I-2952) beträchtlich wirksamer als das 4-Sulfanilamido-2,5,6-trimethoxypyrimidin (I-2950),

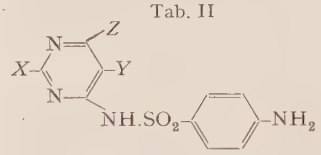
Tab. I



Präparat Nr.	X	Y	Z	Fp. °C	Darstellungsmethode	R.C.A.[a]
I-2586	H	OCH_3	H	214–216	A	0,09±0,07
I-1013	H	OC_2H_5	H	204–205	A	0,14
I-2580	H	OC_3H_7-*n*	H	205–207	A	0,3
I-2581	H	OC_4H_9-*n*	H	224–225	A	0,9
I-2582	H	OC_4H_9-sec	H	206–208	A	0,4
I-2642	H	OC_6H_5	H	237	A	0,48
I-2655	OH	OCH_3	H	262–264	D	0,91
I-2583	OCH_3	OCH_3	H	215	A	0,66
I-1018	OCH_3	H	OCH_3	174–175	A[3]	0,07
I-2952	OCH_3	OCH_3	OCH_3	204–205	A	0,25
I- 890	OH	H	CH_3	251–254	D[4]	0,15

[a] R.C.A. bedeutet die relative chemotherapeutische Aktivität bei experimenteller Infektion der weissen Mäuse unter den im Text beschriebenen Versuchsbedingungen.

Tab. II



Präparat Nr.	X	Y	Z	Fp. °C	Darstellungsmethode	R.C.A.
I-2951	H	OCH_3	H	242	B	0,59
I-2654	CH_3	OCH_3	H	213–214	B	0,48
I-2588	OCH_3	OCH_3	H	263–264	A	0,95
I-2950	OCH_3	OCH_3	OCH_3	201–203	B	0,32
I-2587	SCH_3	OCH_3	H	218–221	C	0,24
I-3063	SCH_3	H	CH_3	210–212	B[5]	0,68
I-3064	SCH_3	H	OCH_3	175–176	A, B	1,0
I-3065	SCH_3	H	OC_2H_5	232–234	A	1,0
I-3066	SCH_3	H	OC_3H_7-i	124–126	A	1,0
I-3068	SCH_3	H	SCH_3	169–171	A	0,95
4-Sulfanilanilamido-2,6-dimethoxypyrimidin, Sulfadimethoxin, Madribon						0,19±0,09
3-Sulfanilamido-6-methoxypyridazin, Sulfamethoxypyridazin, Kynex						0,18
3-Sulfanilamido-1-phenylpyrazol, Sulfaphenazol, Orisul						0,23

intraperitoneal infizierten weissen Mäusen geprüft. Die Substanzen wurden den Tieren in Dosen von 10 mg/kg einmal täglich 5 Tage nacheinander gegeben und nach weiteren 5 Tagen die Ergebnisse gewertet. Aus der Überlebenszeit der einzelnen Versuchstiere und der Kontrollgruppe, das heisst der infizierten, aber nicht behandelten

[1] Diese Mitteilung wird ungekürzt in der Zeitschrift Českoslov. farm. erscheinen.

[2] H. Bretschneider und W. Klötzer, Monatsh. *87*, 136 (1956).

[3] F. L. Rose und G. A. P. Tuey, J. chem. Soc. *1946*, 81.

[4] F. L. Rose und G. Swain, J. chem. Soc. *1945*, 689.

[5] H. J. Backer und A. B. Grewenstuck, Rec. Trav. chim. Pays-Bas *64*, 115 (1945).

was mit dem über die gegenseitige Stellung der Sulfanilamido- und der Methoxygruppen gesagten übereinstimmt. Der Ersatz des Methoxyls durch die Methylmercaptogruppe übte einen recht ungünstigen Einfluss auf die chemotherapeutische Wirksamkeit aus (I-3064, I-3068, I-3065).

Bei der Synthese der besprochenen Sulfonamide benutzten wir folgende Verfahren:

1. Sulfanilierung der betreffenden 2-Amino- bzw. 4-Amino-alkoxypyrimidine durch Einwirkung von *p*-Acetamidobenzensulfochlorid im Pyridin (Methode A).

2. Behandeln von Na-Sulfanilamid mit den entsprechenden Alkoxypyrimidyl-4-trimethylammoniumchloriden nach BRETSCHNEIDER und KLÖTZER[2] (Methode B).

3. Verschmelzen einer Mischung von Sulfanilamid, 4-Chlor-2-methalmercapto-alkoxypyrimidin und Pottasche (Methode C).

4. 2-Sulfanilamido-4-hydroxy-5-methoxypyrimidin wurde durch Kondensation von Sulfaguanidin mit dem Na-Enolat des Methoxyformylessigsäuremethylesters dargestellt (Methode D).

Summary. Some new 2- and 4-sulfanilamido-5-alkoxypirimidines and their hydroxy-, methoxy-, methylmercapto- and methyl-derivatives were prepared. All of the substances described were tested on white mice infected with *Streptococcus pyogenes*.

Z. BUDĚŠÍNSKÝ und V. BYDŽOVSKÝ

Forschungsinstitut für Pharmazie und Biochemie, Praha (Czechoslovakia), 4. November 1960.

cis-Cyclohexane-1,2-Diol in the Beaver Gland

We wish to report the isolation of the title compound from the scent glands of the Canadian beaver. The glands were extracted with alcohol and the 'basic' material, obtained from this extract by a conventional distribution between ether and aqueous sulfuric acid, was subjected to a fractional distillation. A fraction boiling at 80–125° (0.08 mm Hg) proved to be crude *cis*-cyclohexane-1,2-diol, while the following oily fraction was almost pure castoramine (125–135°/0.08 mm Hg)[1]. A clean separation of the two compounds could then be achieved by alumina chromatography. The appearance of the diol in the basic extract is due to the fact that its solubilities in ether and water are of a comparable magnitude. Additional amounts could therefore be obtained by a continuous ether extraction of the appropriate aqueous layers (total yield = 0.2% of semi-dried glands).

The diol, purified by distillation, chromatography and crystallization from ether (m.p. 96–97°) proved to be identical in all respects (m.p., mixed m.p., IR, NMR) with a synthetic specimen prepared by oxidation of cyclohexene with sodium chlorate and osmium tetroxide[2]. The identity was further confirmed by the preparation of the crystalline dibenzoate.

cis-Cyclohexane-1,2-diol has not been previously reported as a beaver gland constituent[3], and, to our knowledge, this communication describes its first isolation from a natural source. It is tempting to speculate that the diol is produced by the beaver by the reduction of catechol (or its derivative), a compound present in the beaver gland[3].

Zusammenfassung. Aus den Biberdrüsen wurde *cis*-Cyclohexan-1,2-diol isoliert und charakterisiert.

Z. VALENTA[4], A. KHALEQUE, and M. H. RASHID

Department of Chemistry, University of New Brunswick, Fredericton (N.B.), November 21, 1960.

[1] Z. VALENTA and A. KHALEQUE, Tetrahedron Letters *12*, 1 (1959).
[2] J. BÖESEKEN and J. VAN GIFFEN, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas *39*, 183 (1920).
[3] E. LEDERER, Perfum. essent. Oil Rec. *40*, 353 (1949).
[4] The support of this work by the Colombo Plan administration of Canada is gratefully acknowledged.

Effect of Iproniazid on Pregnancy

From the observations that reserpine influences the vaginal cycle and reduces fertility in rats[1,2], it has been concluded that serotonin may interfere with pregnancy[3]. Thus POULSON et al.[3] have shown that serotonin can inhibit implantation and can terminate an established pregnancy in mice; they further demonstrated that implantation can also be prevented by injecting large doses of 5–10 mg of iproniazid per mouse and day over 6 days. It seemed important to know, if this effect of iproniazid on implantation can be considered specific or whether it is a side effect appearing only with high doses. We therefore tried to find inhibition of implantation in mice with smaller doses and with shorter treatment.

The results are given in the accompanying Table. It appears that, with the exception of a single series, the iproniazid treated mice showed the same frequency of pregnancies as their controls, irrespective of dose or time of administration of the drug during the critical period of implantation. Also the number of young per litter was the same in treated and in control animals. The table also shows that reduced fertility after 100 mg/kg on day 5 of pregnancy was only observed in one group of animals, but not in a second parallel series of mice.

From our experiments, we conclude that iproniazid does not interfere with implantation in our mice. The discrepancy between our results and those of POULSON et al.[3] is difficult to explain. The discrepancy could be accounted for by assuming a metabolic difference in the animals used. Or one can argue that treatment with 200 mg/kg of iproniazid on 6 consecutive days has unfavorably altered the endocrine balance by interference on the level of the hypothalamo-pituitary axis. TUCHMANN-DUPLESSIS' experiments[2] show that reserpine probably interferes with implantation by acting on the level of the pituitary. Typically, when placentation was complete, the effect of reserpine on fertility diminished, and this is just what happened also in POULSON's et al. experiments with iproniazid[3]: In the second half of pregnancy the effect of iproniazid was practically nil, while sensitivity to exogeneous serotonin was much greater than in the first half of pregnancy. SPECTOR[4] working with another M.A.O. inhibitor, chronically given to rats and mice with the effect of reduced fertility, also offers as an alternative to specific action at the site of implantation the same explanation, i.e. that M.A.O. inhibitors may well act *via* the central nervous system and the pituitary, and this is made very probable by the recent paper of KHAZAN et al.[5]. Our conclusion is, therefore, that M.A.O. inhibitors may under certain conditions indirectly interfere with implantation, but that this action is not to be considered a specific one.

[1] R. GAUNT, A. A. RENZI, N. ANTONCHAK, G. J. MILLER, and M. GILMAN, Ann. N.Y. Acad. Sci. *59*, 22 (1954).
[2] H. TUCHMANN-DUPLESSIS and L. MERCIER PAROT, C. R. Acad. Sci. (Paris) *243*, 410 (1956).
[3] E. POULSON, M. BOTROS, and J. M. ROBSON, Science *131*, 1101 (1960).
[4] W. G. SPECTOR, Nature *187*, 515 (1960).
[5] N. KHAZAN, F. G. SULMAN, and H. Z. WINNIK, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *105*, 201 (1960).

Iproniazid and implantation in mice.
Days of pregnancy were counted with day 1 as the day on which the vaginal plug was observed. Injections in saline subcutaneously

Iproniazid mg/kg	Day of treatment	Number of successful pregnancies *versus* number of ♀ with vaginal plugs
2×12	6, 7	6/6
2×25	6, 7	6/6
2×50	6, 7	3/3
2×100	6, 7	9/10
2×200	6, 7	2/2
0		8/8
100	6	4/4
100	5	3/6
100	5	3/3
0		8/10
100, 50	4, 5	3/4
100	4	2/3
0		2/3
2×100	4, 5	12/12
0		14/16

Zusammenfassung. Iproniazid-Behandlung von befruchteten Mäusen soll durch Serotoninanhäufung mit der Implantation interferieren. Unsere gezielteren Versuche ergaben bei mit Iproniazid behandelten Mäusen normale Fruchtbarkeit. Wir schliessen, dass Iproniazid nicht spezifisch mit der Implantation interferieren kann.

E. Flückiger and R. Salzmann

Pharmakologische Laboratorien, SANDOZ AG, Basel, December 20, 1960.

Serotoninantagonismus an der Placenta

Serotonin-Injektionen lösen bei Ratte und Maus leicht Infarzierungen verschiedener Organe aus, weshalb vorgeschlagen wurde, diese Erscheinung an der Rattenniere zur Testierung von Serotoninantagonisten zu verwenden[1]; die hierfür verwendete intraperitoneale Dosis von Serotonin beträgt 100 mg/kg. Wir haben festgestellt, dass die Placenta in der zweiten Hälfte der Tragzeit bei Maus und Ratte auf bedeutend geringere Mengen subkutan verabreichtes Serotonin anspricht, ohne dass in der Niere oder einem anderen Organ makroskopisch Infarkterscheinungen beobachtet werden. Die vaskuläre Reaktion der Placenta auf Serotonin führt bei geeigneter Dosierung zum Tod der Foeten innert 3–4 h. Dieser Serotoneffekt schien uns dank seiner Eindeutigkeit und Raschheit geeignet, die Wirksamkeit von Serotoninantagonisten miteinander zu vergleichen.

Serotonin in 0,9% NaCl wurde subkutan 17–19 Tage trächtigen Mäusen 30 min nach Vorbehandlung injiziert. Die Vorbehandlung bestand in subkutaner Injektion von 0,3–0,5 cm³ 0,9% NaCl mit oder ohne Antagonist. 4 h nach der Serotonininjektion wurden die Tiere im Ätherrausch dekapitiert und geöffnet: In den eröffneten Uteri wurde die Zahl der toten und lebenden Foeten gezählt und der Zustand der Placenta notiert. Als Kriterium für den Serotoninantagonismus wurde also das Überleben von Foeten nach einer sicher tötenden Serotonindosis verwendet. Im Bereich der ED_{50} wurden pro Dosis minimal 5 Weibchen bzw. 50 Foeten zur Beurteilung der Schutzwirkung verwendet. Die ED_{50} der Serotonin-Antagonisten wurde nach der Probit-Methode graphisch ermittelt.

Folgende Stoffe wurden verglichen: 1. D-Lysergsäurediaethylamid (LSD-25, Delysid®). 2. 1-Methyl-D-Lysergsäure-propanolamid (PML-946). 3. 1-Methyl-D-Lysergsäure-butanolamid (UML-491, Deseril®).

Resultate. Nach Vorversuchen wurden als Serotoninindosis 15 mg/kg und eine Wartefrist von 4 h gewählt: bei insgesamt 26 Kontrolltieren wurden so 144 von 152 Foeten getötet.

Die drei untersuchten Serotoninantagonisten erwiesen sich auch in dieser Versuchsanordnung als stark aktiv: Ihre Dosis-Wirkungskurven verlaufen im mittleren Wirkungsbereich parallel zueinander, so dass ein direkter Vergleich ihrer ED_{50} zulässig ist.

Für LSD wurde eine ED_{50} von ca. 30 µg/kg ermittelt. PML erzielte eine ED_{50} von 9 µg/kg, und für UML wurde bei 3,7 µg/kg Maus noch eine 50%ige Schutzwirkung gefunden. UML (Deseril®) erwies sich somit als rund 8mal wirksamer als LSD und ca. 2,5mal wirksamer als sein Propanolanaloges PML.

Am Serotoninödem der Rattenpfote wurde ein Aktivitätsverhältnis LSD:PML:UML von 1:2,6:4,4 gefunden[2] und am isolierten Rattenuterus ist UML 4mal stärker serotoninhemmend als LSD[3]. An der Placenta kann sich, wie die vorliegenden Versuche ergaben, der die Serotoninhemmung steigernde Effekt der 1-Methylierung der D-Lysergsäure noch stärker entfalten; dies wird besonders deutlich beim Vergleich der verwendeten Dosen von Agonist und Antagonist, die im Falle von UML (Deseril®) bei 50% Hemmwirkung an der Placenta sich wie 1:4000 verhalten.

Es dürfte deshalb von Interesse sein, den Wirkungsmechanismus, der diesem Antagonismus an der Placenta zugrunde liegt, näher zu untersuchen.

Summary. The placentae of 17 to 19 days pregnant mice respond to subcutaneous serotonin (15 mg/kg) with vascular changes which lead to the death of the fetuses in 3–4 h. Pretreatment of the females with D-lysergic acid derivatives preserves the life of the young. Thus, LSD showed an ED_{50} of only 30 µg/kg, while UML (Deseril®) gave an ED_{50} of 3.7 µg/kg. PML takes an intermediate position. At a 50% efficiency level, UML (Deseril®) antagonises the effect of a 4000 times higher dose of serotonin.

E. Flückiger und R. Salzmann

Pharmakologische Laboratorien der SANDOZ AG., Basel, 29. Dezember 1960.

[1] G. Jasmin und P. Bois, Labor. Investig. *9*, 503 (1960).
[2] W. Doepfner und A. Cerletti, Int. Arch. Allergy *12*, 89 (1958).
[3] A. Fanchamps, W. Doepfner, H. Weidmann und A. Cerletti, Schweiz. med. Wschr. *90*, 1040 (1960).

PRO EXPERIMENTIS

The First Axenic Cultivation of a Rotifer Species[1]

The cultivation, in the absence of living organisms (and living cells) of other species, for long periods and with repeated subculturing—in other words, the sustained *axenic* cultivation—of members of the aschelminth Class Rotifera has not been claimed heretofore[2]. Two groups of

[1] The early part of this work was done at the Laboratory of Comparative Biology, Kaiser Foundation Research Institute, Richmond (California) and was supported, in part, by Grants G-6018 and G-13138 from the National Science Foundation.
[2] Except in a brief abstract: E. C. Dougherty, B. Solberg, and D. Joanne Ferral, Anat. Rec. *138*, 344 (1960).

workers have reported brief axenic maintenance of the monogononts *Brachionus variabilis*[3,4] and *Lecane inermis*[4] and of the bdelloid *Philodina acuticornis* var. *odiosa*[4], but, for the most part, these organisms have merely survived without appreciable development. We are now able to report conditions whereunder the continuous cultivation of *L. inermis* has been realized.

During a period of almost three years numerous media, based on complex preparations, variously of vertebrate and bacterial origin, were tried, but failed to lead to axenic cultivation—first for *B. variabilis* and lately for *L. inermis* and *P. acuticornis*. The media in which, by contrast, *L. inermis* has now grown and reproduced for successive generations in serial subculture contain, as the crucial ingredient, a heated (lamb) liver extract (HLE) prepared according to a strict recipe[5] and sterilized by passage through an ultrafilter (Millipore).

The axenic *L. inermis* currently maintained by us descend from cultures originally established with rotifers that had been reared monoxenically[4] with an unidentified species of Gram-negative, rod-shaped bacteria. In the initial successful experiment, axenizing was accomplished by our selecting several dozen individuals with micropipettes, passing them through one rinse of 0.5 ml pond water previously sterilized by ultrafiltration (twice through sintered glass), and leaving them for approximately 2 h in ca. 20 ml distilled water containing, per ml, 1000 u K · penicillin G and 100 γ streptomycin · SO_4. Individuals were then transferred through one further sterile pond water rinse into 0.1% Horlick's malted milk, pending inoculation into small test tubes (10 mm outer diameter), each containing 0.2 ml medium to be tested. Each tube received a single rotifer and thereafter was tightly stoppered. Except (presumably) where injured or past reproductive age, such isolated individuals inoculated into suitable media became the progenitors of cultures consisting, at their acme, of some hundreds of active rotifers. Subsequently, subcultures have been readily initiated with single individuals from thriving axenic populations. Indefinite maintenance, in axenic culture, of *L. inermis* thus appears possible, just as has been demonstrated for several rhabditid nematodes[6], of which *Caenorhabditis briggsae*, now six years in continuous axenic cultivation in cell-free, liquid media, has been longest maintained.

HLE is not tolerated by *L. inermis* at $^1/_4$ dilution (the most concentrated tested), and only moderately well at $^1/_8$. At $^1/_{16}$ dilution growth is excellent. Initially the HLE was doubly supplemented with a 'GM' vitamin mix (at 1% the level used for *C. briggsae*[7]) plus Horlick's malted milk (at 0.075%); but current experiments demonstrate that HLE alone suffices.

Success in the axenic cultivation of *L. inermis* now opens the way to the development of chemically defined (holidic[8]) media for it, following the general pattern already set by studies with *C. briggsae*, for which a considerable advance toward such a medium has been realized[7]. These and similar organisms, grown axenically in holidic media, should in time become elegant tools with which to probe fundamental biological problems—particularly those depending for solutions upon the penetrating insights that comparative animal biochemistry and nutrition, as mature and mobilized disciplines, will inevitably provide.

Résumé. Le Rotifère monogononte *Lecane inermis*, a été mis par les auteurs en cultures axéniques capables de sous-cultivation indéfinie. C'est le premier Rotifère soumis à cette expérience.

E. C. DOUGHERTY[9], B. SOLBERG, and D. JOANNE FERRAL

Laboratory for Gnotobiotic Studies, Berkeley (California), October 22, 1960.

[3] H. A. NATHAN and A. D. LADERMAN, Ann. N. Y. Acad. Sci. *77*, 96 (1959).

[4] E. C. DOUGHERTY, B. SOLBERG, and L. G. HARRIS, Anat. Rec. *137*, 350 (1960); Science *132*, 416 (1960).

[5] Originally developed by Dr. F. W. SAYRE (Laboratory of Comparative Biology) for studies on the nutrition of the nematode *Caenorhabditis briggsae* and generally prepared as follows: a liver from a freshly slaughtered lamb is allowed to age at 4°C for 24 h, then homogenized in a Waring Blendor with equal parts, w./v., distilled water, and thereafter heated in 100 ml amounts to 53°C in a water bath and maintained at that temperature, with constant stirring, for exactly 6 min; next the product is centrifuged in the cold at 20000 G, and the supernatant (HLE) decanted and ultrafiltered immediately, or frozen pending filtration; filter d or unfiltered, it is stored at −17°C. The use of HLE in thesetudy of nematode nutrition has not yet been reported in published form.

[6] W. L. NICHOLAS, E. C. DOUGHERTY, and E. L. HANSEN, Ann. N. Y. Acad. Sci. *77*, 218 (1959).

[7] E. C. DOUGHERTY, E. L. HANSEN, W. L. NICHOLAS, J. A. MOLLETT, and E. A. YARWOOD, Ann. N. Y. Acad. Sci. *77*, 176 (1959).

[8] E. C. DOUGHERTY, Ann. N. Y. Acad. Sci. *77*, 51 (1959); in J. N. SASSER and W. R. JENKINS (Eds.), *Nematology, Fundamentals and Recent Advances with Emphasis on Plant Parasitic and Soil Forms* (Univ. N. Carolina Press, Chapel Hill 1960), p. 291.

[9] Address as of February 1961: Department of Nutrition, College of Agriculture, University of California, Berkeley.

PRO EXPERIMENTIS

On the *in vitro* Bioassay for Measuring Melanophoretic Activity

This report will describe several modifications of the *in vitro* frog skin bioassay of SHIZUME et al.[1] as used in this laboratory for the estimation of melanophoretic activity. Particular attention has been directed toward the development of a 4-point assay procedure which can be easily controlled by classical mathematical analysis[2].

Materials and Methods. Pieces of skin of the legs and thighs of *Rana pipiens* frogs which have been kept in constant light for at least 2 weeks are removed, trimmed, and placed in concentric rings in a manner similar to that described previously[1]. Anodization of the aluminum parts of these rings was found to prevent completely the corrosion which occurs normally on the untreated aluminum parts when immersed in the electrolyte solutions. Anodized rings have been used here for more than 2 years without evidence of corrosion.

Variations in successive reflectance measurements on fragments of skin during control periods were encountered in early work with the assay; these were due essentially to disorientation of the skin fragment for each reading from the position in which it was first placed for the original reading. To remedy this, the bakelite outer rings[1] were designed with four equidistant V-shaped notches in the base to correspond to four ridges which we had sealed by fusion in the bottoms of 50 ml pyrex beakers. These ridges extend from the edge of the beaker about a third of the way to the center. A clear area remains in the center of the beaker through which the reflectance readings are taken. The same apparatus as employed by SHIZUME et al. (Photovolt Photoelectric Reflection Meter Model 610, Photovolt Corporation, New York) is used to indicate changes in reflectance of the skins. The use of these 'inter-

[1] K. SHIZUME, A. B. LERNER, and T. B. FITZPATRICK, Endocrinology *54*, 553 (1954).

[2] C. I. BLISS, *The Statistics of Bio-Assay* (Academic Press, Inc., Publ. New York 1952), 1 vol.

Beaker	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Sample	LL_1	RT_1	LT_1	RL_1	RL_2	LT_2	RT_2	LL_2	LL_3	RT_3	LT_3	RL_3	RL_4	LT_4	RT_4	LL_4
Addition	S_1	S_2	U_1	U_2	S_1	S_2	U_1	U_2	S_2	S_1	U_2	U_1	S_2	S_1	U_2	U_1

locking' rings and beakers has eliminated the variation to such a degree that a skin may be removed from and then replaced in a beaker with changes of no more than 0.5 to 1.0 reflectance unit in the successive readings. A mark made on the base of each beaker is lined up with a mark on the head of the search unit for each reading, to insure that the position of a skin over the field of light will not vary. A 250 ml beaker darkened inside with flat black paint is placed on the top of the search unit over the samples as they are read in order to eliminate the effect of extraneous light. With these precautions constant readings of control skins over a period of time may be observed. No filters are used and the measurements are made with the white light from the bulb of the search unit, the galvanometer set to 100 with the grey enamel standard No. 2 furnished with the Reflection Meter.

The MSH-standard used is an aliquot of the original preparation reported by SHIZUME et al.[1]. It has a melanophoretic activity of 2.5×10^4 units/mg by definition, 1 unit equivalent to 0.04 μg. It is diluted to concentrations of 0.4 μg/ml, and 0.133 μg/ml to be used as high (S_2) and low (S_1) standards corresponding to 10.00 and 3.33 MSH units/ml respectively. The frog Ringer's solution (NaCl 6.50 g/l, KCl 0.14 g/l, $CaCl_2$ g/l, $NaHCO_3$ 0.20 g/l) in which all standards or unknowns are diluted is prepared using de-ionized (Crystalab Deeminizer – Dynalab Corporation) distilled water having less than one part per million of electrolyte. Standards and unknowns are always added in a volume of 1.0 ml to the skins which are maintained in 20.0 ml of the Ringer solution. To insure mixing of materials added, the solution is stirred and bubbled with the pipette as the 1.0 ml aliquot is introduced. During the period in which the melanophoretic response is achieved, the beakers containing the skins are incubated in a 22–23°C water bath, optimal temperature for the response having been described as 20–25°C[1].

The design of both the 4-point and bracketed assays in this laboratory utilize 16 specimens of skin, and thus 4 frogs. The samples of skin are removed and placed in a specific order in beakers numbered from 1 to 16, as indicated in the Table so that each group of S and U will have an homogenous population (as to origin) of skin fragments.

In this arrangement LL signifies left leg, RT indicates right thigh, etc., and the subscript number identifies the frog from which the skin was taken. S_1, S_2, U_1, and U_2 represent the low and high standards and unknowns. It should be noted from their distribution in the Table that there will be one response for each skin from each of the frogs used, and that every standard and unknown is applied to a LL, RT, LT, and RL. Thus in a 4-point assay, we have a total of 16 observations, i.e. 4 observations per dose of U_1, U_2, S_1, S_2. In a bracketed assay the skins used for U_1 and U_2 may be substituted in use for as many as 8 different unknowns. The measurements are made as follows:

Y_1: Is the reading of the reflectance of the skins after they have been allowed to lighten and equilibrate in frog Ringer for 60 min. (The solution has been changed once during this hour.) When Y_1 is recorded, 1.0 ml of S_2 (0.4 μg/ml; 10 MSH units) is added to *each* beaker.

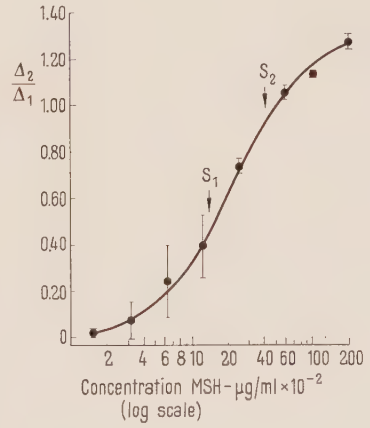
Y_2: Is the reading taken 60 min after the additions made at Y_1. During this hour the skins will have approached a maximal response to the material added. Immediately following this reading the Ringer solution over all skins is changed. The samples are again allowed an hour period to lighten during which the solution is changed once.

Y_3: Is the reading taken then: it is followed by the addition of both standards and unknowns as described in the Table. At this time the Y_3 reading should be checked against the initial reading Y_1, and discard made of skins not returning to within 5 reflectance units of the first (Y_1) reading.

Y_4: Is the final reading and is taken 60 min after the additions made at Y_3.

The difference between the first two readings ($Y_1 - Y_2$) is designated as Δ_1, and that between the second two ($Y_3 - Y_4$) as Δ_2. The ratio of Δ_2/Δ_1 is determined for each of the 16 responses, and a standard curve is plotted on semi-log graph paper using the mean values obtained for S_1 and S_2. The Δ_2/Δ_1 readings for the unknowns may then be applied to the graph and computed into terms of MSH units. The curves for S and U can also be calculated mathematically[2].

A log dose-response evaluation of the MSH standard was made and the sigmoid curve shown in the Figure obtained. The mean responses shown with their standard errors were achieved using a log-interval of 2 and duplicate observations (i.e. 2 skins per dose). It can be seen that the 0.4 μg/ml and 0.133 μg/ml values chosen to be used for S_2 and S_1 in all subsequent assays fall within the linear portion of the curve.



Dose-response curve for MSH reference standard in the *in vitro* assay

[3] A. V. SCHALLY and R. GUILLEMIN, Texas Rep. Biol. Med. *18*, 133 (1960).

[4] A. V. SCHALLY, R. N. ANDERSEN, J. M. LONG, and R. GUILLEMIN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *104*, 290 (1960).

[5] R. GUILLEMIN and W. KRIVOY, C. R. Acad. Sci. (Paris) *250*, 1117 (1960).

[6] R. GUILLEMIN, A. V. SCHALLY, R. N. ANDERSEN, H. S. LIPSCOMB, and J. M. LONG, C. R. Acad. Sci. (Paris) *250*, 4462 (1960).

[7] *Acknowledgments.* This work was supported by research grants (No. A-2543, C_1, C_2) from the National Institute of Health (NIH) of the U.S. Public Health Service and Contract No. AF 419657)-224 with the School of Aviation Medicine, U.S. Air Force, Wright Air Development Division, Lackland Air Force Base, Texas.

Statistical analysis of the dose-response relationship of the S_1 and S_2 standards from 22 individual assays has been made. In 17 of these assays there were 4 responses for each of the standards, in 3 assays there were three, and in 2 assays only two responses per dose of S_1 and S_2. Results of the analysis are as follows: Composite slope $b_c \pm$ S.E. $= 1.41 \pm 0.14$; mean $\lambda = s/b \pm$ S.E. $= 0.247 \pm 0.0273$; variance s between slopes = not significant at $p = 0.005$. The spread of samples was fairly large about the composite line, but much less so in individual assays. There was no significant difference between the slopes of the 22 assays when considered as a group. The constancy of the slope between assays would indicate that the composite curve may be used as a nomogram to evaluate relative activity between several samples assayed in one experiment. Classical 4-point assays with a set of standards should always be run if an accurate absolute value in MSH units/mg is desired on any given material.

This assay has been used extensively in this laboratory over the last three years to our satisfaction for determining the specific MSH activity of given materials and to follow with great accuracy purification procedures on various starting materials containing α-MSH, β-MSH or related peptides[3-6].

Résumé. Les auteurs décrivent diverses modifications au test original de Shizume et al. pour mesurer l'activité mélanophorétique *in vitro*. Une analyse mathématique des résultats obtenus avec cet étalonnage en montre les caractéristiques satisfaisantes.

J. M. Long[7] and R. Guillemin

Department of Physiology, Baylor University College of Medicine, Houston (Texas), and Laboratoire de Morphologie expérimentale et Endocrinologie, Collège de France, Paris, December 16, 1960.

PRO EXPERIMENTIS

Quelques commentaires sur les méthodes de culture *in vitro* de jeunes blastodermes de poulet[1]

La possibilité d'opérer de jeunes blastodermes d'oiseaux non dans l'œuf, mais en culture *in vitro*, offre des avantages évidents et de longue date diverses techniques sont employées dans ce but. Le procédé courant consiste à élever le blastoderme sur un substratum nutritif ferme et fibreux. Waddington[2] utilisait du plasma sanguin de poule et du jus embryonnaire coagulés. Depuis les investigations de Spratt[3] on ajoute de la gélose au milieu nutritif proprement dit pour lui conférer une certaine consistance. La composition de ce milieu diffère largement selon les auteurs et les buts de leurs recherches. D'après Spratt l'albumen seul, ou mélangé au vitellus, satisfait le mieux aux besoins nutritifs de l'embryon, tandis que Wolff et Simon[4] préconisent l'emploi de jus embryonnaire. Dans ces conditions de culture le développement du corps embryonnaire peut se poursuivre normalement, surtout si le blastoderme a été étalé sur le substratum après la formation des ébauches axiales. Cependant, l'extension périphérique du blastoderme est toujours arrêtée.

En 1955 New[5] a démontré que cette extension est due à l'adhérence du bord d'enveloppement à la membrane vitelline laquelle doit être légèrement tendue. Le bord d'enveloppement, en s'élargissant grâce à la prolifération active de ses cellules, et en glissant sur la membrane vitelline, étire littéralement le blastoderme tout entier. Partant de ces observations, New a élaboré une technique de culture *in vitro* beaucoup plus proche des conditions du développement normal. On immerge le jaune d'œuf dans une solution physiologique; on découpe la membrane vitelline autour du blastoderme selon le plan équatorial qui lui correspond. Le cercle de la membrane vitelline, détaché du vitellus, est étalé, le blastoderme en haut, sur un verre de montre et alors on pose un anneau de verre sur la membrane vitelline. Ensuite la solution physiologique est déversée du verre de montre et une petite quantité d'albumen est introduite sous la membrane vitelline. Pour l'incubation l'ensemble est mis dans une chambre humide. Dans ces conditions aussi bien le développement et la croissance du corps embryonnaire que l'extension périphérique du blastoderme se poursuivent normalement jusqu'au moment où l'embryon atteint le stade auquel, s'il était dans l'œuf, il aurait commencé à s'enfoncer dans le vitellus.

Rappelons encore que, comme New[6] l'a démontré, le blastoderme absorbe l'eau de l'albumen ce qui permet à son feuillet interne de sécréter abondamment le liquide contenu normalement dans la cavité sous-germinale. Contrairement donc aux cultures, où le blastoderme est situé à l'interface du substratum nutritif et de l'air saturé de vapeur d'eau, les blastodermes élevés selon la technique de New se développent dans un milieu liquide normal. Une petite quantité de ce liquide s'accumule entre le blastoderme et la membrane vitelline, en formant une mince couche limitée périphériquement par le bord d'enveloppement qui adhère étroitement à la membrane, tandis que le liquide sécrété par l'entophylle le submerge d'une couche de plus en plus épaisse.

La méthode de New, si satisfaisante soit-elle, présente, néanmoins, un certain désavantage: elle ne permet guère de pratiquer sur les blastodermes cultivés de multiples interventions expérimentales lesquelles doivent être faites du côté dorsal. Si l'on détache le blastoderme pour le remettre en sens inverse sur la membrane, le bord d'enveloppement, grâce à l'affinité de sa face externe pour la membrane vitelline, s'enroule et après quelque temps le blastoderme prend la forme d'une vésicule. Récemment, New[7] a essayé d'étaler le blastoderme, sa face ventrale en bas, sur la face externe de la membrane vitelline. Dans cette position, le bord d'enveloppement n'adhère pas à la membrane et ni son enroulement ni extension périphérique du blastoderme n'ont lieu. Signalons à ce propos un fait que New semble ignorer: la membrane qui englobe la sphère vitelline d'un œuf pondu est en réalité composée de la membrane vitelline proprement dite et d'une mince couche d'albumen extrêmement visqueux, le même qui forme les chalazes. Si ce n'était pas le cas, leur fixation sur le globe vitellin aurait été incompréhensible. D'autre part, pendant le passage du vitellus dans la trompe, de petites hémorragies se produisent fréquemment et alors des caillots de sang se déposent sur la membrane vitelline. Or, les coupes histologiques de cette dernière, prélevée sur un œuf pondu, montrent que ces caillots, pourvu qu'ils soient suffisamment minces, sont englobés entièrement dans les couches superficielles de la «membrane vitelline».

Afin de trouver une technique de culture permettant d'opérer aisément des blastodermes du côté dorsal et garantissant simultanément leur extension périphérique

[1] Travail subventionné par le Fonds national suisse de la Recherche scientifique.

[2] C. H. Waddington, Phil. trans. Roy. Soc. B. *221*, 179 (1932).

[3] N. T. Spratt, J. exp. Zool. *106*, 345 (1947).

[4] Et. Wolff et D. Simon, C. R. Acad. Sci. *241*, 1994 (1955).

[5] D. A. J. New, J. Embryol. exp. Morph. *3*, 326 (1955).

[6] D. A. J. New, J. Embryol. exp. Morph. *4*, 221 (1956).

[7] D. A. J. New, J. Embryol. exp. Morph. *7*, 146 (1959).

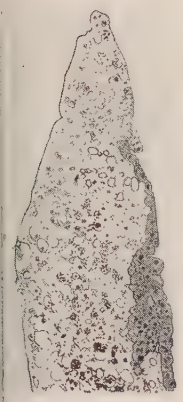


Fig. 1

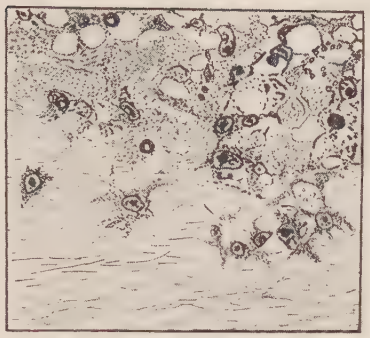


Fig. 2

Fig. 1. Bord d'un blastoderme cultivé sur le milieu solide. Le rampart vitellin dépasse périphériquement le feuillet externe lequel assume l'aspect d'un épithélium cubique. La zone périphérique de l'ectophylle, correspondant au bord d'enveloppement d'un embryon normal, est constituée par un bourrelet pourvu d'excroissances irrégulières et par un liséré composé de cellules plus aplaties.

Fig. 2. Interface du milieu nutritif à base d'agar et du rempart vitellin. Les cellules des couches profondes de ce dernier prennent la forme étoilée et pénètrent dans le substratum où elles constituent une sorte de syncytium.

normale, nous avons tout d'abord étudié en détail le comportement des blastodermes cultivés sur des milieux nutritifs contenant de l'agar et leurs rapports avec le substratum. Nous avons essayé divers milieux nutritifs, celui de Wolff et Simon, et ceux de Spratt que nous avons parfois modifiés. Sur ces multiples milieux le développement des blastodermes ne présente pas de différences vraiment appréciables. En fin de compte, nous avons choisi comme «milieu standard» le mélange de la solution d'agar à 3% dans le tyrode (3 parts), de l'albumen (4 parts) et du sérum de cheval (2 parts). L'adjonction de ce dernier facilite, en effet, l'hématopoïèse dans l'aire vasculaire.

Les blastodermes, au stade de la ligne primitive, sont étalés sur le milieu nutritif et cultivés sous un contrôle fréquent pendant 24 h et plus. Ensuite, ils sont fixés au Bouin, soit détachés du milieu nutritif soit avec leur substratum, et examinés histologiquement sur des coupes sériées. Une dizaine de blastodermes ont été mesurés au début et à la fin de leur culture. Non seulement leur extension périphérique n'a pas été constatée, mais, au contraire, ces blastodermes se sont légèrement contractés. Ce phénomène semble être dû à l'élasticité du feuillet externe. Comme on le voit sur les coupes, le rempart vitellin dépasse périphériquement le «bord d'enveloppement». L'ectophylle, composé normalement de cellules fortement amincies, assume alors l'aspect d'un éphithélium cubique (Fig. 1). Rappelons que le bord d'enveloppement normal est formé d'un bourrelet plus ou moins épais et d'un liséré composé d'éléments cellulaires plus ou moins aplatis et s'étalant directement sur le vitellus. La forte colorabilité de ce bourrelet au bleu de toluidine, laquelle disparaît après le traitement à la ribonucléase, semble prouver qu'il constitue la zone de prolifération cellulaire intense assurant la croissance périphérique rapide du blastoderme (Gallera et Oprecht[8]). L'extension de nos blastodermes étant bloquée, le bord d'enveloppement ne peut plus s'étirer et le matériel cellulaire, en s'accumulant dans son bourrelet, forme des excroissances irrégulières pénétrant plus ou moins profondément dans le rempart vitellin (Fig. 1). Ce dernier est plus épais que la norme et il se plisse en formant des ondulations orientées radialement au corps embryonnaire. L'aire vasculaire est visiblement trop étroite par rapport à ce dernier de sorte que la tête et le bourgeon tronco-caudal de l'embryon surplombent le rempart vitellin.

L'examen des coupes histologiques des blastodermes fixés avec leur substratum a révélé que les cellules du rempart vitellin, en particulier dans sa zone périphérique, prennent la forme étoilée et pénètrent plus ou moins profondément dans l'agar imbibé de substances nutritives où elles forment un véritable réseau, reconstituant ainsi une sorte de «syncytium vitellin» (Fig. 2). Ces observations nous ont amenés à nous poser la question si l'arrêt de l'extension périphérique du blastoderme cultivé sur le substratum fibreux est exclusivement dû à l'absence de la membrane vitelline. Pour résoudre ce problème, quelques blastodermes, détachés avec la membrane vitelline du jaune d'œuf, sont étalés face ventrale contre notre milieu nutritif standard. Un anneau en verre, de diamètre plus large que celui du blastoderme, est posé sur la membrane vitelline et enfoncé dans le substratum. Cette opération est faite afin que la membrane vitelline soit uniformément tendue. Les blastodermes en question s'étalent progressivement sur le milieu nutritif, cependant leur extension est toujours sensiblement moindre que s'ils étaient cultivés selon la méthode de New. L'extension périphérique de nos blastodermes ne concerne, d'ailleurs, que l'ectophylle seul. Le bord d'enveloppement est toujours excessivement large, quoique ses dimensions varient considérablement d'une région à une autre. En effet, le contour externe du rempart vitellin, toujours épais et ondulé, est des plus irréguliers et dans les zones où il dessine de larges promontoires, le rempart vitellin est toujours disloqué sur de plus ou moins grandes étendues au niveau desquelles le blastoderme n'est formé que de l'ectophylle. L'examen histologique confirme entièrement ces observations faites *in toto*. Le rempart vitellin, accroché par sa face ventrale au substratum et adhérant fortement par sa face dorsale à l'ectophylle qui s'étend progressivement, se déchire par endroits et ses parties périphériques sont entraînées par le bord d'enveloppement.

Notre étude comparative nous permet de conclure que l'accrochage du rempart vitellin prohibe toute extension périphérique du blastoderme sur les milieux solides, quelle que soit leur constitution nutritive. La présence de la membrane vitelline, comme New l'a démontré, est indispensable à une extension normale. Nous avons donc modifié sa méthode, de façon à rendre possible des interventions du côté dorsal. A cette fin, la membrane vitelline est étalée sur un anneau de verre, le blastoderme en bas, donc en contact direct avec l'albumen. Un autre anneau de diamètre plus grand est emboîté sur le premier pour tendre uniformément la membrane vitelline et la maintenir. Les blastodermes ainsi cultivés se développent parfaitement et se prêtent bien à des colorations vitales localisées et même des interventions micro-chirurgicales peuvent être pratiquées à travers une petite incision dans la membrane vitelline.

Summary. The relationship between yolk entoblast and the nutritional medium in cultures of chicken blastoderm, classical type, was studied. In addition, some refinements to the research of New[5–7], and some modifications permitting operations from the dorsal side, are proposed.

J. Gallera et G. Nicolet

Laboratoire d'Embryologie expérimentale, Institut d'Anatomie, Université de Genève (Suisse), le 24 novembre 1960.

[8] J. Gallera et E. Oprecht, Rev. Suisse de Zool. *55*, 243 (1948).

STUDIORUM PROGRESSUS

Substantivity and other Factors Responsible for Formazan Patterns in Dehydrogenase Histochemistry

Introduction. The superiority of some newer tetrazolium salts for the visualisation of reductase activity at the cellular level is due mainly to two factors. First, a relatively high reduction potential of the tetrazole and secondly, the property of forming dense, insoluble, non-crystalline formazan pigments[1]. The localisation of formazan in tissue sections, and the possibility of staining enzymically active intracellular organelles, has been assumed to depend on certain properties of the final pigment, namely insolubility and binding to proteins. The latter quality has been described as substantivity for protein. With the exception of a report by WATTENBERG[2], no further reference has been made to binding capacities of tetrazolium compounds to tissue constituents and the possibility that pigment distribution may depend on adsorption of the dye-precursor (indicator) seems largely to have been neglected.

With this factor in mind we examined the substantive properties of a number of mono- and di-tetrazoles and were able to demonstrate a strongly enhanced adsorption, particularly to lipoprotein structures, of compounds bearing polar groupings at the 2-position. It appeared possible that this property could determine the intracellular distribution of enzymically produced formazan pigment.

Materials and Methods. Fresh frozen sections, 2 μ in thickness, cut on a cryostat and 3 μ frozen sections from tissue fixed for 16 h at 4° in formol-calcium were incubated for various periods of time at 20° in solutions of tetrazolium salt in buffer containing 0.1 mg salt per ml. After incubation, the sections were washed in three changes of buffer and distilled water for 30 min and immersed for 2 min in 0.12 *M* sodium carbonate solution containing 0.1 *M* ascorbic acid (pH 8.5). The influence of pH on tetrazole adsorption and elution was tested using 0.1 *M* acetate buffer pH 2–5.5; 0.06 *M* phosphate buffer pH 5–8; 0.2 *M* borate buffer pH 7.5–9. The following tetrazolium salts were tested: (Tab. I and II).

In order to achieve enzymic reduction of tetrazole, Nitro-BT (XIII) and MTT (I) were incorporated in media and used for the demonstration of reduced diphosphoyridine nucleotide (DPNH)-tetrazolium reductase and lactate dehydrogenase in formalin fixed[3] or cryostat sections[4,5]. The latter were also stained for succinate dehydrogenase and β-hydroxybutyrate dehydrogenase activity using MTT-Co[6] or Nitro-BT[4]. Bound tetrazole after pre-treatment of sections with Nitro-BT was reduced enzymically according to WATTENBERG[2].

Experiments similar to those performed on tissue sections were carried out on samples of rat liver microsomes prepared according to POPJÁK et al.[7], and on rat liver mitochondria prepared in 0.35 *M* sucrose[8]. Both microsomes and mitochondria were used in suspension and as smear preparations.

Samples of purified lipid fractions and proteins, adsorbed to filter paper (Whatman No. 1), to cellulose acetate membranes, or affixed on glass slides, were treated with tetrazolium solution and after washing subjected to alkaline reduction. The following substances were tested: glyceryl triolate, diolein, triolein, glyceryl tristearate, phosphoryl choline chloride, lecithin, cephalin, ganglioside, cerebroside, sphingomyelin, cholesterol stearate, 2-methyl-3-phytyl-1:4-naphthoquinone (vitamin K_1), 2-methyl-1:4-naphthoquinone (vitamin K_3), 2-methyl-3-hydroxy-1:4-naphthoquinone (phthicocol), serum albumin, γ-globulin (bovine), ovalbumin.

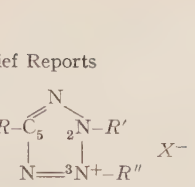
Results. Mild alkaline reduction produced formazan staining of tissue sections, isolated mitochondria and microsomes which had been pre-treated with any one of the ditetrazoles listed above. The most intense staining was obtained with Nitro-BT and its non-crystalline formazan pigment revealed intracellular structures distinctly. Similar staining was achieved by alkaline reduction of tissue sections pre-treated with the monotetrazolium salts INT (III), M and B 1762 A (VII) and 1767 (IV). The other monotetrazoles tested (I, II, V, VI, VIII, IX, X) were not bound by tissue structures and no staining was obtained when the washed sections were placed in the reducing solution. The adsorption of Nitro-BT was a rapid process. At pH 7, this tetrazolium salt was retained by lipoprotein structures after 5 sec treatment, and after 90 sec treatment dense staining of intracellular structures was obtained upon subsequent reduction. Incubation for 3 min resulted in maximum adsorption of tetrazole. Substantive mono- and di-tetrazoles were bound to tissue components at neutral and alkaline pH; below pH 5, adsorption did not occur. Adsorbed tetrazole was eluted by acidic buffer solutions. In contrast to tissue sections, purified lipids adsorbed tetrazole within the acid range.

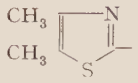
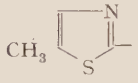
Formalin fixation of tissue increased the binding of substantive tetrazoles, especially Nitro-BT, and lipoprotein structures became distinctly outlined on development of the formazan pigment. In rat kidney tubular cells, for example, the mitochondrial pattern was revealed clearly (Fig. 1). Infoldings of the basal cell membranes[9] were heavily stained and could be distinguished from the mitochondria by their looplike arrangement (Fig. 2). Nuclear membranes were outlined and red cell envelopes irregularly stained after tetrazole treatment for longer than 90 sec. The staining pattern obtained by enzymic reduction of Nitro-BT using, for example, DPNH as a substrate was very similar to that obtained on non-enzymic reduction of adsorbed Nitro-BT (Fig. 3).

Non-substantive and some substantive tetrazolium salts, after reduction by tissue enzyme systems, give rise to particulate formazans. In most cases these are easily recognisable as crystals. An exception is MTT-Co where the particulate end product is a round deposit of metal formazan of high density, which bears no resemblance to the easily produced crystals of this complex. The particulate pigment is distributed at regular intervals along active mitochondria, yielding a dot-like or (under favourable conditions) a spiral-like pattern[10]. This pattern is preserved in formalin-fixed tissue (Fig. 4). Enzymic

[1] A. G. E. PEARSE, *Histochemistry, Theoretical and Applied*, 2nd Ed. (Churchill, London 1960).
[2] L. W. WATTENBERG, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *87*, 535 (1954).
[3] A. B. NOVIKOFF and B. MASEK, J. Histochem. Cytochem. *6*, 217. (1958).
[4] M. M. NACHLAS, D. G. WALKER, and A. M. SELIGMAN, J. biophys. biochem. Cytol. *4*, 29 (1958).
[5] D. G. SCARPELLI, R. HESS, and A. G. E. PEARSE, J. biophys. biochem. Cytol. *4*, 747 (1958).
[6] R. HESS, D. G. SCARPELLI, and A. G. E. PEARSE, J. biophys. biochem. Cytol. *4*, 753 (1958).
[7] G. POPJÁK, L. GOSSELIN, I. Y. GORE, and R. G. GOULD, Biochem. J. *69*, 238 (1958).
[8] W. C. SCHNEIDER and G. H. HOGEBOOM, J. biol. Chem. *183*, 123 (1950).
[9] J. RHODIN, Intern. Rev. Cytol. *7*, 485 (1958).
[10] A. G. E. PEARSE and D. G. SCARPELLI, Nature *181*, 702 (1958). – D. G. SCARPELLI and A. G. E. PEARSE, Anat. Rec. *132*, 133 (1958).

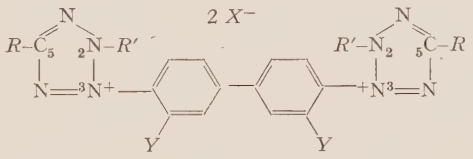
Tab. I. Monotetrazolium salts



Compound		R	R'	R''	X^-	Substantivity[a]
I	MTT[b]	C_6H_5	C_6H_5		Br	0
II	5-MTT[b]	C_6H_5	C_6H_5		Br	0
III	INT[c]	C_6H_5	p-I-C_6H_4	p-NO_2-C_6H_4	Cl	++
IV	M and B 1767[d]	C_6H_5	C_6H_5	p-$C_6H_5CH=CHC_6H_4$	Cl	+
V	M and B 1689 A[e]	C_6H_5	C_6H_5	p-$C_6H_5N=NC_6H_4$	I	0
VI	M and B 1795[e]	p-HOC_6H_4	C_6H_5	p-$C_6H_5N=NC_6H_4$	Cl	0
VII	M and B 1762 A[e]	C_6H_5	C_6H_5	α-p-$C_6H_5N=NC_{10}H_6$	I	++
VIII	BCT[f]	C_6H_5	C_7H_4NS	$HOOCC_6H_4$	–	0
IX	[g]	C_6H_5	C_7H_4NS	p-NO_2-C_6H_4	Br	0
X	TTC[h]	C_6H_5	C_6H_5	C_6H_5	Cl	0

[a] Substantivity for fresh frozen or formalin fixed sections. Conditions see text.
[b] H. Beyer and T. Pyl, Ber. dtsch. chem. Ges. *87*, 1505 (1954).
[c] S. W. Fox and E. H. Atkinson, J. Amer. chem. Soc. *72*, 3629 (1950).
[d] A. W. Nineham, D. L. Pain, and R. Slack, J. chem. Soc. *1954*, 1568.
[e] A. W. Nineham, D. L. Pain, and R. Slack, J. chem. Soc. *1954*, 1565.
[f] G. G. Glenner, personal communication.
[g] S. S. Karmarkar, A. G. E. Pearse, and A. M. Seligman, J. org. Chem. *25*, 575 (1960).
[h] H. von Pechmann and P. Runge, Ber. dtsch. chem. Ges. *27*, 2920 (1894).

Tab. II. Ditetrazolium salts



Compound		R	R'	Y	X^-	Substantivity[a]
XI	BT[i]	C_6H_5	C_6H_5	OCH_3	Cl	+
XII	NT[k]	C_6H_5	C_6H_5	–	Cl	+
XIII	Nitro-BT[l]	C_6H_5	p-NO_2-C_6H_4	OCH_3	Cl	++++
XIV	Tetranitro BT[l]	p-NO_2-C_6H_4	p-NO_2-C_6H_4	OCH_3	Cl	++
XV	[g]	C_6H_5	C_7H_4NS	OCH_3	Cl	+

[a] Substantivity for fresh frozen or formalin fixed sections, Conditions see text.
[i] A. M. Rutenburg, R. Gofstein, and A. M. Seligman, Cancer Res. *10*, 113 (1950).
[k] W. Antopol, S. Glaubach, and L. Goldman, Publ. Health Rep. Wash. *63*, 1231 (1948).
[l] K. C. Tsou, C. S. Cheng, M. M. Nachlas, and A. M. Seligman, J. Amer. chem. Soc. *78*, 6139 (1956).

formation of metal-formazan particles is not confined to structurally intact mitochondria but occurs also with submitochondrial fragments[11] and, in the case of microsomal enzymes, with agglutinated microsomal particles. Fig. 5 shows the particulate formazan pattern of MTT-Co produced by microsomal DPNH-tetrazolium reductase activity of a smear preparation of rat liver microsomes. A similar pattern was obtained with reduced triphosphopyridine nucleotide as a substrate. Microsomal smears were stained as a structureless layer by Nitro-BT regardless of whether the diformazan was produced enzymically or non-enzymically (Fig. 6). When using MTT methods for the demonstration of strictly mitochondrial enzymes, as succinate[12], β-hydroxybutyrate[13] or α-glycerophosphate dehydrogenase[14], active sites are most numerous in cellular areas where the mitochondria are numerous. In the epithelia of rat epididymis and vas deferens, for example, reactions for these enzymes were restricted to the luminal portion of the cells. This region can be shown to contain most of the mitochondria[15] (Fig. 7–9). Clear distinction

[11] A. G. E. Pearse, D. G. Scarpelli, and R. Hess, J. biophys. biochem. Cytol. *7*, 243 (1960).
[12] G. H. Hogeboom, W. C. Schneider, and G. E. Pallade, J. biol. Chem. *172*, 619 (1948).
[13] A. L. Lehninger, H. C. Sudduth, and J. B. Wise, J. biol. Chem. *235*, 2450 (1960).
[14] R. L. Ringler and T. P. Singer, Arch. Biochem. Biophys. *77*, 229 (1958).
[15] N. Shor, personal communication.

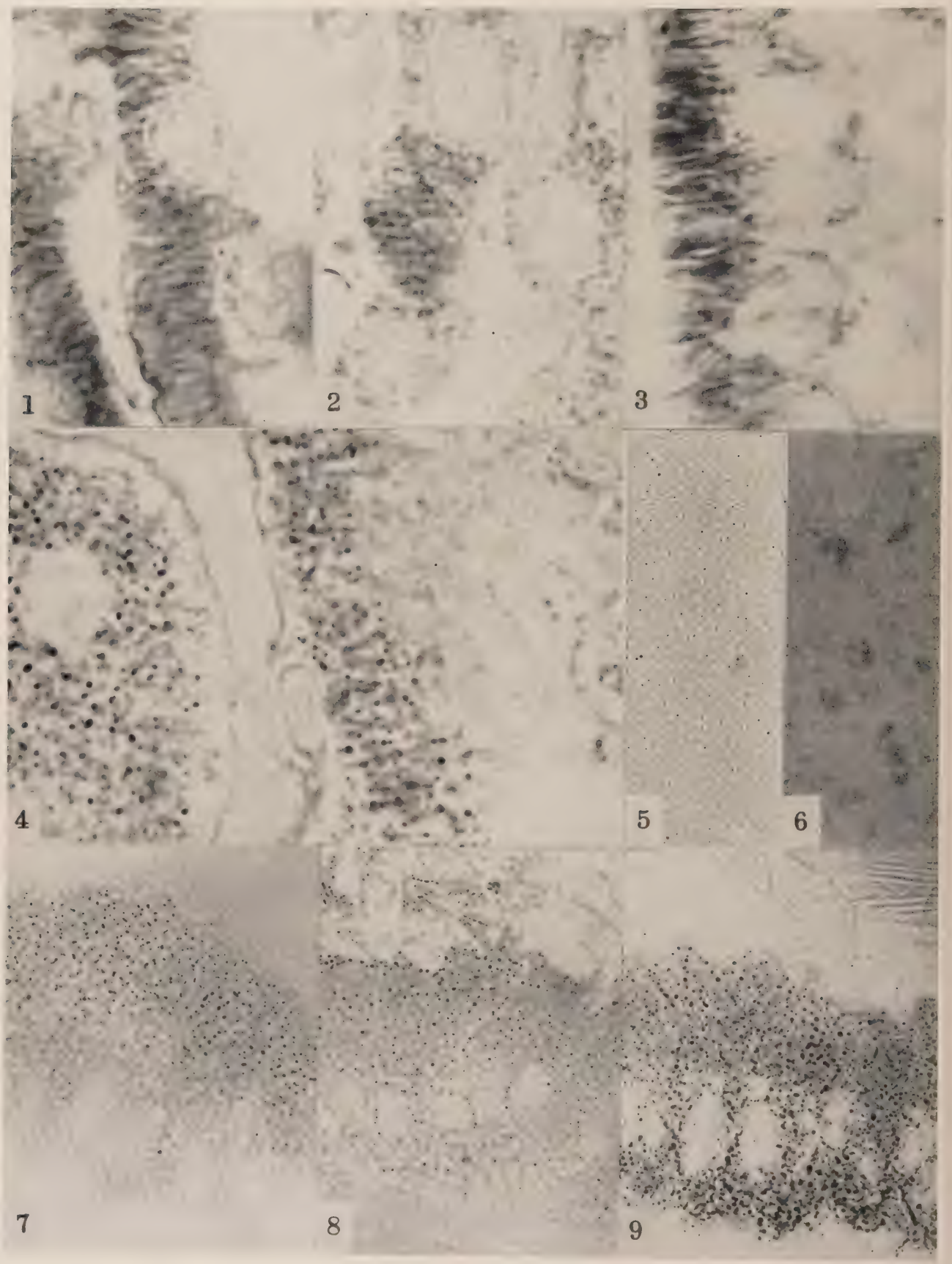

1
2
3
4
5
6
7
8
9

Fig. 1. 3 μ frozen sections of proximal tubule of rat kidney. Staining of both membranous and mitochondrial structures by diformazan produced by alcaline reduction of substantive Nitro-BT. ×2450.
Fig. 2. Same section as Figure 1. Non-enzymic formazan staining of infoldings of cytoplasmic membrane. Distal tubule ×2450.
Fig. 3. Serial section to Figure 1. Enzymic reduction of Nitro-BT by DPNH-diaphorase reaction results in a staining pattern very similar to that obtained on reduction of adsorbed ditetrazole by ascorbate. ×2450.
Fig. 4. DPNH-diaphorase reaction on cells of proximal tubule from formalin-fixed rat kidney using MTT-Cobalt as electron acceptor. Particulate metal-formazan is deposited in mitochondrial areas. ×2450.
Fig. 5. Particulate monoformazan obtained by incubating rat liver microsomes in a medium containing MTT, Co^{++} and DPNH as a substrate. ×1000.
Fig. 6. Diffuse enzymic staining of microsomal aggregates by Nitro-blue formazan. DPNH-diaphorase reaction. ×1000.
Fig. 7. Epithelia of rat vas deferens. α-glycerophosphate dehydrogenase reaction using a MTT-Co method, 5 min incubation. Particulate formazan is deposited in mitochondria-rich portions facing the lumen. 2 μ cryostat section. ×1000.
Fig. 8. Serial section to Figure 7. Demonstration of β-hydroxybutyrate dehydrogenase activity in luminal parts of vas deferens epithelia and in mitochondrial equivalents composing the midpiece of spermatozoa. ×1000.
Fig. 9. DPNH-diaphorase reaction. Metal formazan is distributed throughout the vas deferens cells due to the joint activities of both mitochondrial and microsomal structures. The latter are mainly confined to the basal portions of the cells. ×1000.

between luminal and basal regions was obtained only when MTT was used as electron acceptor. The substantive Nitro-BT produced a uniform staining of the whole cell with formazan and after incubation for more than 15 min detail was lost due to crystallisation along numerous fat vacuoles (Fig. 10, 11). With DPNH as a substrate, particulate MTT-Co formazan was deposited throughout the cells. This appearance is considered to be due to a participation of both mitochondrial and microsomal tetrazolium reductase activity.

In order to exclude the possibility that the distribution pattern of reductase activity observed is peculiar to tetrazole as final electron acceptor, cryostat sections of vas deferens were incubated in media containing dehydrogenase substrate and Janus Green B as indicator. Media for the demonstration of succinate, α-glycerophosphate and DPNH reductase activity were prepared as a modification of the method of Cooperstein, Dixit and Lazarow[16]. The reduction of Janus Green B to its leuco derivative in vas deferens epithelia closely followed the pattern described above for MTT-reductase activity. This result does not support the view that, in tissue sections, Janus Green B can be used to distinguish mitochondria from microsomes[16].

Lipoprotein structures devoid of mitochondrial matrix but intimately associated with mitochondria became uniformly stained in formalin-fixed or cryostat sections incubated in media containing Nitro-BT for demonstrating dehydrogenase activity. Examples of such structures are: Protein absorption droplets in the nephron (Fig. 12, 13), motor-end plates on enzymically active muscle fibres and myelinated nerve fibres in voluntary muscle (Fig. 14). Reactions for the mitochondrial enzymes succinate dehydrogenase and β-hydroxybutyrate dehydrogenase were capable of staining such structures, although to a lesser degree than reactions for partially soluble enzymes as, for instance, lactate dehydrogenase. Nuclear membranes required an incubation time longer than 30 min to become enzymically stained. Strong enzymic and non-enzymic staining with Nitro-BT of cytoplasm and dentritic fibres was obtained with the lipid rich central nervous system (Fig. 15).

Due to the effect of freezing and thawing, fragmentation of mitochondria and membrane structure was apparent in thin cryostat sections stained with diformazan of Nitro-BT (Fig. 16). Gross mitochondrial structure was preserved and well demonstrated in parallel sections which were postchromed by the method of Elftman[17] and stained for phospholipids with Luxol fast blue, Sudan black or Solochrome cyanine R (Fig. 17).

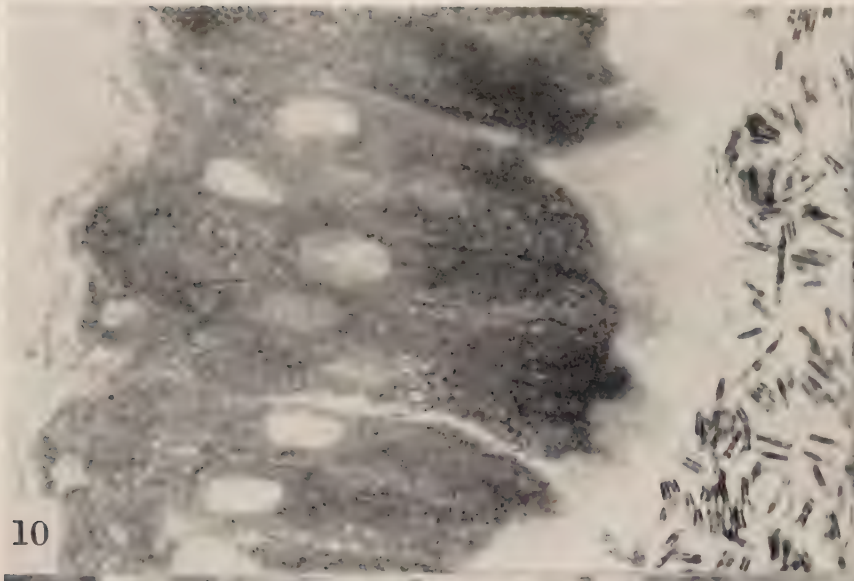
Binding of Nitro-BT and other ditetrazoles to both formalin-fixed and frozen-thawed sections, was reduced by chromium mordanting at 60°[17] or by oxidation with $KMnO_4$. Cryostat sections, postfixed in formalin and subsequently treated with Nitro-BT, revealed a globular staining pattern on reduction and loss of mitochondrial detail. Adsorption of Nitro-BT to lipid structures was abolished by the presence of polyvinylpyrrolidone (PVP) 7.5%, dextran 6%, or methylcellulose 7.5% in the medium, presumably by competitive interaction of these substances. Sucrose (0.88 *M*) slowed down binding to lipids, without visibly altering the substantive properties of tetrazoles.

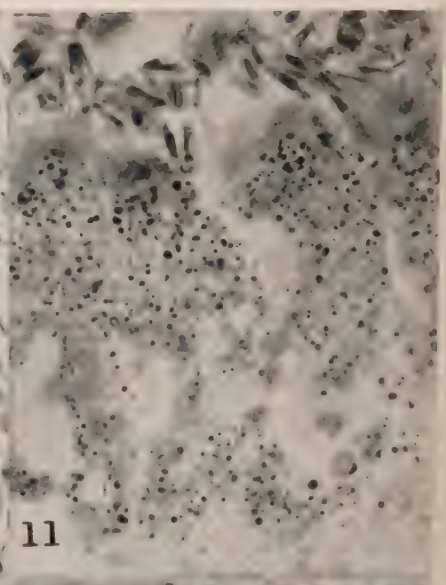
With the exception of glyceryl tristearate, all the lipid fractions tested were capable of binding Nitro-BT, lecithin being most active. Less polar ditetrazoles combined weakly, and non-substantive monotetrazoles were not adsorbed. Phthiocol, above pH 6.5, formed water-soluble red complexes with all the tetrazoles examined. Of the crystalline proteins tested, only γ-globulin bound Nitro-BT to a slight degree. Under the conditions used, Nitro-BT and other ditetrazoles were adsorbed weakly to supporting cellulose, or cellulose acetate.

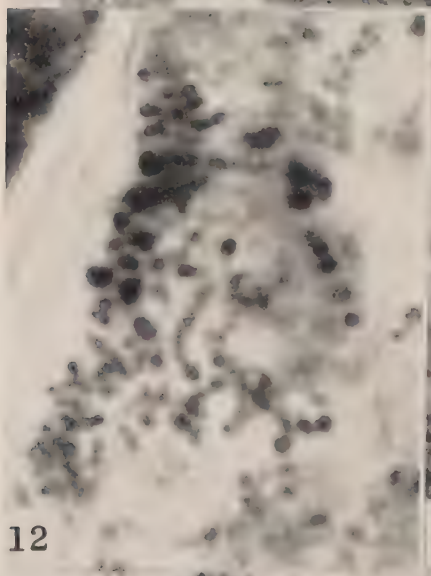
Discussion. A survey of a limited number of tetrazolium salts has shown that preferential adsorption of tetrazole by lipoprotein-containing cell structures may be related to a) the planar ditetrazole molecule containing the substituted benzidine nucleus and b) to polar groupings attached to the 2-position of the tetrazole ring. The first property puts ditetrazoles (and also monotetrazoles bearing large benzeneazo-substituents in the 3-position) in a group of substantive compounds related to direct dyes for cellulose[18] of the general type: $R_1{-}N{:}N{-}X{-}N{:}N{-}R_2$. Substantivity for lipoprotein, however, seems mainly to be conferred on the molecule by the second mentioned factor. This would explain the substantive properties of the monotetrazole INT. Substantivity is greatly enhanced by a combination of a) and b) as is the case with Nitro-BT. Competing electro-negative groups in position 5 apparently are capable of inhibiting the effect of similar groups in the 2-position; tetra-Nitro-BT is less substantive than Nitro-BT. The binding of the tetrazoles to tissue structures seems to be due to weak electrostatic forces, as adsorption is readily reversed by changes in pH. It is likely that the effective 2-*p*-nitrophenyl radical is present as pseudo-acid since it interacts with tissue at neutral or alkaline pH.

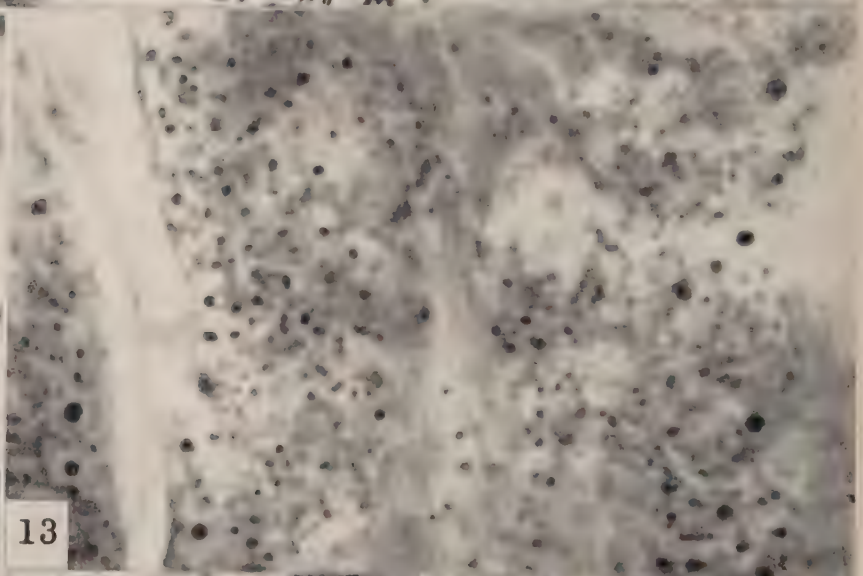
The term 'substantivity' should be used only in a broad sense with reference to histochemical systems. In dye chemistry, substantivity is defined as the property of a compound to become adsorbed by a fibrous substrate from a solution[19], and, quantitatively, is determined as adsorbability minus desorbability[20].

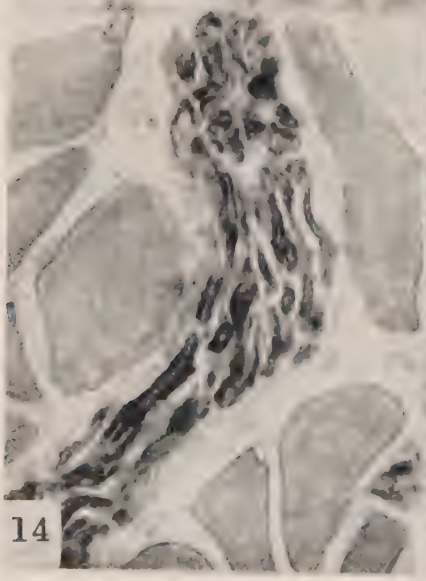
[16] S. J. Cooperstein, P. K. Dixit, and A. Lazarow, Anat. Rec. *138*, 49 (1960).
[17] H. Elftman, J. Histochem. Cytochem. *2*, 1 (1954).
[18] T. Vickerstaff, *The Physical Chemistry of Dyeing*, 2nd Ed. (Oliver & Boyd, London 1954).
[19] J. Wegmann, Textil-Rundschau 1959, No. 11.
[20] P. Ruggli, J. Soc. Dyers & Col. Jubilee Vol. 1934, p. 77.

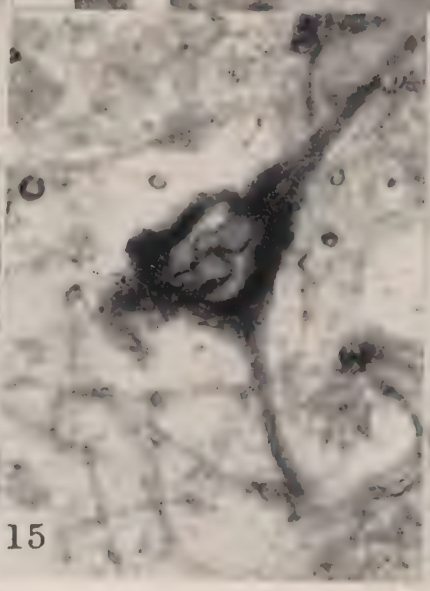

10

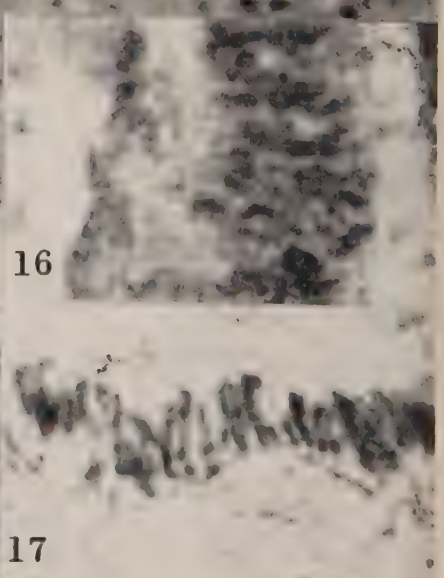

11


12


13


14


15


16

17

Fig. 10. Same reaction as Figure 7, but with Nitro-BT as an electron acceptor. Diffuse staining of cytoplasm, except fat vacuoles. Note staining of basement membrane. × 1250.

Fig. 11. β-Hydroxybutyrate dehydrogenase reaction using Nitro-BT. Incubation for 30 min results in crystallisation of uniformly deposited diformazan, mainly in the vicinity of fat vacuoles. × 1000.

Fig. 12. Formazan staining of protein absorption droplets in proximal tubular cells of rat kidney (18 h after intraperitoneal injection of ovalbumin). DPNH-diaphorase reaction on formalin-fixed tissue, using Nitro-BT. × 3000.

Fig. 13. Serial section to Figure 12. In contrast to other cytoplasmic sites, protein droplets are not stained by DPNH-diaphorase reaction when MTT-Co is used as an electron-acceptor. × 3000.

Fig. 14. Strong non-enzymic staining of myelinated nerve in rat pelvic muscle by reduction of adsorbed Nitro-BT. × 380.

Fig. 15. Diformazan staining of ganglionic cell and neuropil by non-enzymic reduction of adsorbed Nitro-BT. Formalin-fixed section of rat cerebral cortex. × 380.

Fig. 16. Diformazan staining of fragmented mitochondrial and membrane structures in a 2 μ cryostat section. Non-enzymic reduction of adsorbed Nitro-BT. × 2450.

Fig. 17. Serial section to Figure 16. Filamentous mitochondrial structures stained by Solochrome Cyanine R after postchroming by the Elftman procedure. × 2450.

Model experiments with various lipid fractions point to a multitude of tissue components which may be responsible for adsorbing tetrazole and it seems difficult to ascribe this property to a single chemical structure. It may be significant that all lipids which were shown to be capable of binding Nitro-BT contain unsaturated radicals. The composition of mitochondrial lipids is complex. Extracts of liver mitochondria for instance, contain cholesterol, sphingomyelin, lecithin and cephalin besides a large, undetermined fraction containing various lipid-soluble vitamins[21]. A great difficulty is encountered in the profound alteration which lipoprotein structures undergo in fixing and in the preparation of frozen-thawed sections. The status of lipid-protein interaction under such conditions is virtually unknown. We were unable to abolish the adsorption of Nitro-BT to sections previously subjected to extraction procedures for phospholipids[1].

Histologically, substantive tetrazoles are adsorbed by membranous lipoproteins structures. It is possible that the strongly substantive Nitro-BT forms a surface layer, the whole of which may be uniformly reduced along a given structure regardless of the site of the initial potential difference. Formazan staining of structures, adjacent to points of high reductase activity may be thus explained. In particular, this may explain the staining of structures like myelin which consist of multi-layered lipoprotein components[22]. Enzymic staining of whole myelinated nerve fibres by Nitro-BT in highly active muscle[23] and spinal cord[24] sections is likely to be an artifact.

A pattern basically different from that obtained by using substantive tetrazoles is formed by enzymically reduced MTT-Co. This particulate formazan does not stain any structure *per se* but appears to reveal the distribution of highly active electron-donating sites. Since formazan production has been shown to be a easumre of specific activity of enzyme particles[11] it can be assumed that dye produced at individual intracellular sites reflects the specific activity of these areas. The particulate structural element responsible for enzymic tetrazolium reduction can be both mitochondrial and microsomal. Alternatively it may not even belong to a morphologically defined entity, as in the case of bacterial cytoplasm[25]. The identical appearance of the particulate formazan, whether produced by suspensions of submitochondrial fractions or by microsomes, provides a reason for our previous failure to demonstrate extramitochondrial tetrazolium reductase[5,6]. It is evident, therefore, that a dot-like formazan pattern can no longer be considered to be due to mitochondrial activity only. In the animal cell, however, mitochondrial activity can be separated by using reactions for enzymes which are firmly structurally bound to mitochondria, namely succinic, β-hydroxybutyric and α-glycerophosphate dehydrogenase.

In enzyme histochemistry, one of whose aims is to characterise intracellular distribution of activity, it seems highly desirable to use non-substantive indicators or substrates giving rise to non-substantive products which, by means of efficient capture reactions, can reveal sites of enzymic activity without morphological bias induced by substantivity.

Zusammenfassung. Es wurden substantive Eigenschaften verschiedener Mono- und Ditetrazoliumsalze gegenüber Gewebebestandteilen im Schnittpräparat untersucht. Ditetrazole werden im allgemeinen stärker vom Gewebe adsorbiert als Monotetrazole. Ausnahmen bilden Monotetrazole mit polaren Substituenten oder Azobenzol-Resten in 3-Stellung. Ditetrazole mit elektronegativen Gruppen in 2-Stellung werden stark von Lipoprotein-Strukturen adsorbiert und zeigen in Modellexperimenten Substantivität für ungesättigte Lipoide. An verschiedenen Beispielen wird die Bedeutung substantiver Tetrazol-Eigenschaften für die Lokalisation von Dehydrogenaseaktivität im Schnittpräparat dargelegt. Die Lokalisation enzymatisch gebildeten Formazans ist im Falle von substantivem Tetrazol ein Ausdruck für die Adsorption der Farbstoffvorstufe an bestimmte Gewebekomponenten. Im Falle von nichtsubstantivem Monotetrazol besteht die Möglichkeit zur Bestimmung von Orten intrazellulärer Enzymaktivität ohne unspezifische Anfärbung von Gewebsbestandteilen. Die Bedeutung der stark voneinander abweichenden Eigenschaften von in der Histochemie gebräuchlichen Tetrazoliumsalzen für die Darstellung intra- und extramitochondrialer Aktivität wird diskutiert.

A. G. E. Pearse and R. Hess[26]

Department of Pathology, Postgraduate Medical School, London (England), November 29, 1960.

[21] R. D. Dallam and L. Shimomura, Arch. Biochem. Biophys. *79*, 187 (1959).

[22] J. B. Finean and J. D. Robertson, Brit. Med. Bull. *14*, 267 (1958).

[23] M. M. Nachlas, K. C. Tsou, E. DeSouza, C. S. Cheng, and A. M. Seligman, J. Histochem. Cytochem. *5*, 420 (1957).

[24] T. Samorajski, J. Neurochem. *5*, 349 (1960).

[25] R. Hess and F. M. Dietrich, J. biophys. biochem. Cytol. *8*, 546 (1960).

[26] *Acknowledgments.* We are indebted to Professor H. Beyer for the gift of MTT, to Dr. A. M. Seligman for Nitro-BT, to Dr. A. W. Nineham for M and B 1762 A and 1767 and to Dr. G. Glenner for BCT. We are grateful to Dr. G. Popják for assistance in the preparation of cell fractions. One of us (A. G. E. P.) is in receipt of a Grant in Aid from the Medical Research Council.

STUDIORUM PROGRESSUS

Die Beeinflussbarkeit der Tiegelschen Kontraktur durch Änderungen der extracellulären Calciumkonzentration

Als «Kontraktion» bezeichnet man den über eine Muskelfaser (bzw. einen Ganzmuskel) mit der Erregung sich rasch fortpflanzenden kurzzeitigen kontraktilen Prozess der Zuckung. Unter «Kontraktur» eines quergestreiften Muskels versteht man eine länger anhaltende, auf den Reizort beschränkte, nicht fortgeleitete (also ohne rhyth-

mische Aktionspotentiale verlaufende) reversible Verkürzung. GASSER[1] hat zum erstenmal diese Gesichtspunkte in seiner klassischen Definition klar herausgestellt. Eine solche Verkürzungsreaktion können physiologischerweise *in corpore* nur Muskelfasern ausführen, die auf einen lokalen Erregungs- und Kontraktionstyp spezialisiert sind, wie zum Beispiel die quergestreiften langsamen Muskelfasern ('slow fibers') des Frosches, die von Aγ-Fasern über «Endtrauben» innerviert werden[2]. Sie stellen – wenn sie in einem Skelettmuskel vorkommen – gegenüber den schnellen Fasern ('twitch fibers') zahlenmässig nur einen kleinen Prozentsatz aller Fasern dar. Künstlich kann man aber im Experiment durch gewisse Substanzen (z. B. Kalium, Acetylcholin u. a.) oder physikalische Einflüsse (z. B. bestimmte elektrische Ströme) an jeder Faser bzw. jedem Muskel unter geeigneten Bedingungen Kontrakturen auslösen[3,4]. Solche künstlichen nicht fortgeleiteten Verkürzungen können auf eine bestimmte Region einer Muskelfaser beschränkt sein oder aber – wenn der Reiz nicht lokalisiert ist – die ganze Muskelfaser ergreifen.

Wenn ein Muskel oder eine Muskelfaser durch einen elektrischen Stromstoss richtiger Stärke und Form gereizt wird, erfolgt eine Zuckung, das heisst eine rasche Verkürzung und Wiederverlängerung. Unter bestimmten Bedingungen kann die Phase der Wiederverlängerung (Erschlaffung) erheblich verzögert werden, oder es kann sich an den ersten Zuckungsgipfel ein zweiter langsamerer, mehr oder weniger hoher Verkürzungsgipfel in der Wiederverlängerungsphase anschliessen. Man bezeichnet das als «Nachkontraktur». Dazu gehören zum Beispiel die Ermüdungskontraktur bzw. die Tiegelsche Kontraktur, die Bremersche «neuromuskuläre Kontraktur» und die Veratrin-Kontraktur, die sich phänomenologisch weitgehend gleichen[5]. Wohl aus diesem Grunde werden oft ziemlich wahllos die verschiedensten Nachkontrakturen (und Verkürzungsrückstände) als Tiegelsche Kontrakturen bezeichnet.

Unter *Tiegelscher Kontraktur* im ursprünglichen Sinne[6] versteht man die schon von KRONECKER[7] beobachtete Erscheinung, dass ein Skelettmuskel nur unvollkommen erschlafft, wenn man ihn mit aufeinanderfolgenden übermaximalen elektrischen Stromstössen direkt reizt (Anhebung der Basislinie = Ermüdungskontraktur). Unter günstigen Bedingungen kann schon ein einzelner direkter supermaximaler Stromstoss eine Nachkontraktur erzeugen, die kleiner, gleich hoch oder höher sein kann als die initiale Zuckung. Auch dies bezeichnet man als Tiegelsche Kontraktur (für Einzelfasern vgl. [8]). Mit diesem Phänomen befasst sich die vorliegende Arbeit.

Den verschiedenen Nachkontrakturen ist, wie die Analyse der elektrischen Vorgänge zeigt, gemeinsam, dass höchstens am Anfang rhythmische Aktionspotentiale vorhanden sind, die rasch in ein persistierendes negatives Nachpotential übergehen. Wegen der Langsamkeit der Vorgänge lassen sich bei den Kontrakturen und Nachkontrakturen die Beziehungen zwischen Erregung (Membrangeschehen) und kontraktilem Prozess und ihre Beeinflussbarkeit leichter untersuchen als bei den schnellen Zuckungen. Es ist daher verständlich, dass Kontrakturen der verschiedensten Genesen in neuerer Zeit ein wichtiges Experimentierobjekt zum Studium der elektromechanischen Kopplungsvorgänge geworden sind[9,10]. Im Rahmen von Untersuchungen über die Bedeutung von Calcium-Ionen bei der Kopplung des Verkürzungsprozesses an den Membranprozess bei Kontrakturen (vorläufige Veröffentlichungen darüber: [11, 12]) haben wir uns auch mit dem Einfluss von Änderungen der extracellulären Calciumkonzentration auf die Tiegelsche Kontraktur befasst. Über die Ergebnisse soll hier kurz berichtet werden.

Methode. Der isolierte *M. sartorius* bzw. *M. rectus abdominis* vom Frosch (*Rana esculenta* und *temporaria*) befindet sich in einem mit Ringerlösung gefüllten Gefäss und ist mit einem isotonischen Hebelsystem verbunden. Der Hebel ist entweder ein reibungsarmer Tangentialschreiber und registriert auf einem Russkymographion, oder – wesentlich besser – er trägt am Ende eine Blende, die sich frei vor einer Photozelle bewegt. Der durch die Längenänderung des Muskels gesteuerte Photostrom wird verstärkt und mit Direktschreibern registriert. Die elektrische Reizung des Muskels erfolgt mit Rechteckimpulsen. Zusammensetzung der Ringerlösung: 115,0 *mM* NaCl; 2,5 *mM* KCl; 1,8 *mM* $CaCl_2$; mit Na-Phosphatpuffer auf pH 7,1 gebracht. Bei calciumfreier Ringerlösung wird $CaCl_2$ durch NaCl ersetzt. Bei calciumreicher Ringerlösung (18 *mM* $CaCl_2$) wird NaCl entsprechend verringert. Der Phosphatpuffer muss hier wegbleiben, da sonst Calciumphosphat ausfällt. Da diese Lösung meist ein wenig sauer ist, wird der pH mit NaOH auf 7,1 eingestellt. Die Lösungen im Versuchsgefäss werden ständig mit CO_2-freier Luft durchperlt. Die Badezeit in calciumfreier oder -reicher Ringerlösung dauerte meist 30–180 min, doch können auch kürzere Zeiten (10–20 min, besonders im Sommer) schon Effekte zeigen.

Die Dynamik der Calciumaufnahme und -abgabe des Muskels soll hier nicht weiter erörtert werden (vgl. [13–19]). Bei entsprechender Expositionszeit nehmen sowohl tonische als auch phasische Muskeln in calciumreicher Ringerlösung Calcium auf und geben es in calciumfreier Ringerlösung ab. Wir haben das gemessen, und es wird durch die erheblichen funktionellen Veränderungen der Muskeln bewiesen, die an den hier wiedergegebenen Abbildungen zu erkennen sind.

Reizt man einen in calciumfreier Ringerlösung gebadeten phasischen Muskel (Sartorius) mit einem übermaximalen elektrischen Stromstoss, so zeigt der abfallende Schenkel der Zuckung eine deutliche Nachkontraktur, die sich rasch löst (Fig. 1a). Wiederholt man den Reiz noch mehrere Male, so werden Zuckungen und Nachkontraktur immer kleiner und der Muskel wird im Erschlaffungszustand unerregbar.

Führt man den gleichen Versuch an einem in calciumreicher Ringerlösung gebadeten Sartorius durch, so resultiert ein völlig anderes Ergebnis (Fig. 1b). Die Nachkontraktur löst sich schon beim ersten Reiz nicht, und mit

[1] H. S. GASSER, Physiol. Rev. *10*, 35 (1930).
[2] ST. W. KUFFLER, Arch. exp. Path. Pharmak. *220*, 116 (1953).
[3] H. REICHEL, *Muskelphysiologie* (Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960).
[4] O. RIESSER, *Kontraktur und Starre*. Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. (Berlin 1925), VIII/1, 218.
[5] O. RIESSER, *Muskelpharmakologie*, in T. GORDONOFF, *Handbuch der Therapie* (Bern 1949).
[6] E. TIEGEL, Pflügers Arch. ges. Physiol. *13*, 71 (1876).
[7] H. KRONECKER, Monatsberichte d. Königl. Academ. zu Berlin (Sitz. 11. 8. 1870), Nr. 3, p. 639.
[8] K. BRECHT und H. FENEIS, Z. Biol. *103*, 354 (1950).
[9] K. E. ROTHSCHUH, Klin. Wschr. *34*, 1049 (1956).
[10] A. SANDOW, Yale J. Biol. Med. *25*, 176 (1952); Amer. J. phys. Med. *34*, 145 (1955).
[11] P. PAUSCHINGER, 26. Tagung d. Deutsch. Physiol. Gesellschaft, Freiburg (Juni 1960).
[12] P. PAUSCHINGER und K. BRECHT, Nature, im Druck.
[13] M. C. BERWICK, J. cell. comp. Physiol. *38*, 95 (1951).
[14] D. L. GILBERT und W. O. FENN, J. gen. Physiol. *40*, 393 (1957).
[15] E. J. HARRIS, Biochim. biophys. Acta *23*, 80 (1957).
[16] L. V. HEILBRUNN, *An Outline of General Physiology* (Philadelphia 1955).
[17] L. J. MULLINS, J. gen. Physiol. *42*, 817 (1959).
[18] A. SHANES, Pharmacol. Rev. *10*, 59, Part I-II (1958).
[19] A. SHANES und C. P. BIANCHI, J. gen. Physiol. *43*, 481 (1960).

jeder weiteren Zuckung setzt sie immer höher am Zukkungsgipfel an. Bald kommen bei einer weit über dem ersten Zuckungsmaximum liegenden Dauerverkürzung keine raschen Zuckungen mehr zustande, sondern nur noch kleine Zusatzkontrakturen. Zuletzt wird der Muskel im Zustand einer starken Dauerkontraktur unerregbar.

Ein prinzipiell ähnliches Bild ergibt sich am Rectus, nur zeigt er – als tonischer Muskel «von Hause aus» – eine stärkere Fähigkeit zur Kontraktur. So muss man ihn länger in calciumfreier Ringerlösung baden, um entsprechende Effekte zu erhalten. In Figur 2a bleibt durch den ersten Reiz eine Nachkontraktur bestehen. Wenn man von ihr absieht, ist das weitere Verhalten ganz ähnlich dem in calciumfreier Ringerlösung gebadeten Sartorius. Der Muskel erschlafft bis zur Unerregbarkeit immer wieder auf dieses Niveau.

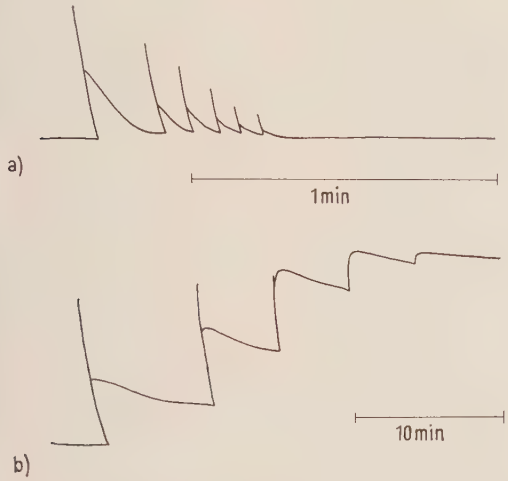


Fig. 1. Aufeinanderfolgende Tiegelsche Kontrakturen von *Mm. sartorii* mit übermaximalen Rechteckreizen. a) Sartorius, der 1 h in calciumfreier Ringerlösung lag. b) Ein anderer Sartorius nach einstündiger Vorbehandlung in calciumreicher Ringerlösung. Siehe Text! (Man beachte die verschiedenen Registriergeschwindigkeiten in a und b.) Versuch vom 16. 8. 1960; *Rana esc.* ♀

Ganz anders verhält sich der calciumreiche Rectus (Fig. 2b). Hier bleibt die Nachkontraktur schon beim ersten Reiz auf der Höhe der Zuckung. Vom dritten Reiz an erfolgen nur noch langsame Zusatzverkürzungen, und der Muskel wird in maximalem Verkürzungszustand unerregbar.

Soweit die Fakten, die zeigen, dass das kontraktile Verhalten von Muskeln entscheidend durch Variation der extracellulären Calciumkonzentration beeinflusst werden kann. Da zur Erzielung solcher Effekte unter Umständen längere Expositionszeiten notwendig sind, dürfte es sich nicht so sehr um Oberflächenwirkungen handeln, sondern um Beteiligung des Calciums an Vorgängen im Innern der Muskelfaser im Anschluss an die Erregung.

Die durch Änderungen der extracellulären Calciumkonzentration bei der Tiegelschen Kontraktur erzielten Effekte gleichen weitgehend denen bei der KCl-Kontraktur (isotonische KCl-Lösung) unter den gleichen Bedingungen der Calciumvariation[11,12]. Das Membranpotential von phasischen und tonischen Muskelfasern ändert sich nur wenig durch Calcium, es steigt um einige Millivolt (3–5 mV) an in calciumreicher Ringerlösung und sinkt um einen ähnlichen Betrag in calciumfreier Ringerlösung. Auch die Depolarisation ist in beiden Fällen gleich stark (auf ca. 10–20 mV) und gleich lang anhaltend unter weiterer Anwesenheit von isotonischer KCl-Lösung. Aber der kontraktile Apparat koppelt bei calciumfreier Vorbehandlung nur sehr kurzzeitig an und Kontrakturen kommen kaum oder gar nicht zustande, während calciumreiche Sartorien und Recti langdauernde Kontrakturen unterhalten. Die Membrandepolarisation ist also nur der auslösende Triggermechanismus für nachgeschaltete Reaktionen, die erst über Ausmass und Dauer der Ankopplung des kontraktilen Apparates entscheiden. Hier – mehr im Innern der Faser – scheint der den Kontraktionsvorgang beeinflussende Angriffspunkt des Calciums bei seiner Freisetzung durch die Membrandepolarisation zu sein, unabhängig von seiner Wirkung auf die Membran (Stabilisierung und Abdichtung). Das ein- oder auswandernde Calcium bewirkt in den von uns variierten Konzentrationen keine Längenänderungen des kontraktilen Apparates bei isotonischer Registrieranordnung unter Normalbedingungen in Ruhe. Das heisst, die bei höherer extracellulärer Calciumkonzentration einwandernden Calcium-Ionen werden sofort gebunden. Die Bindungskapazität der Muskelfaser für Calcium ist relativ gross[14]. Erst wenn die extracelluläre Calciumkonzentration zu hoch wird (z. B. bei isotonischer $CaCl_2$-Lösung) dürften freie Calcium-Ionen im Innern der Faser auftreten und den Verkürzungsmechanismus direkt (ohne Membrandepolarisation) in Gang bringen (Calciumkontraktur).

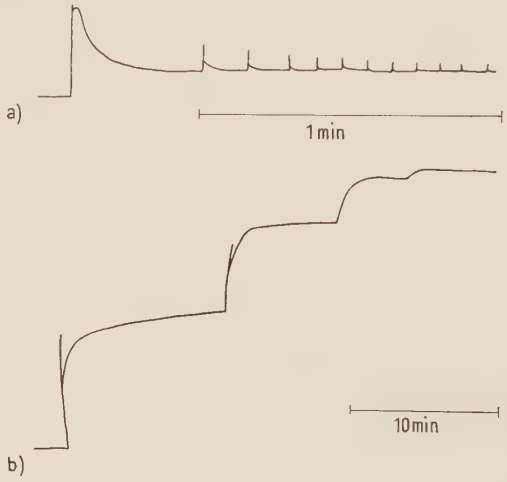


Fig. 2. Aufeinanderfolgende Tiegelsche Kontrakturen von *Mm. recti abdominis* mit übermaximalen Rechteckreizen. a) Rectus nach einstündiger Vorbehandlung in calciumfreier, b) in calciumreicher Ringerlösung. Siehe Text! (Man beachte die verschiedenen Registriergeschwindigkeiten in a und b.) Versuch vom 16. 8. 1960; *Rana esc.*♂

Leider wissen wir noch kaum etwas über diese «Aktivator»-Eigenschaft bei der Ankopplung des kontraktilen Apparates in der lebenden Muskelfaser. Aus den Ergebnissen der Muskelmodellversuche ist bekannt, dass Calcium für die Verkürzung der Modelle direkt nicht notwendig ist. Die Bedeutung der Calcium-Ionen liegt danach in der Hemmung des «Erschlaffungsfaktors». Dieser ist wirksam (in Ruhe bzw. in der Erschlaffungsphase), wenn freie Calcium-Ionen fehlen, das heisst gebunden sind, zum Beispiel an Aktomyosin (bei Anwesenheit freier Magnesium-Ionen). Bei der Kontraktion (Verkürzungsphase) sollen Calcium-Ionen freigesetzt und an den Erschlaffungsfaktor gebunden werden, der dadurch inaktiviert wird und die ATP-Spaltung freigibt. Ausserdem soll der Erschlaffungsfaktor nicht mehr hemmend auf die ATP-Spaltung wirken (auch nicht bei Abwesenheit freier Calcium-Ionen), wenn die ATP-Konzentration zu gering ge-

worden ist; zum Beispiel vor dem Beginn eines *Rigor mortis* (vgl. [20]).

Wenn man diese Beobachtungen an den Modellen zur Erklärung der von uns an der Tiegelschen Kontraktur erhobenen Befunde heranzieht, so könnte der calciumreiche Muskel deshalb in maximaler Dauerkontraktur verharren, weil im Überschuss freigesetzte Calcium-Ionen den Erschlaffungsfaktor völlig hemmen, während die ATP-Spaltung weitergeht und den Verkürzungszustand aktiv aufrecht erhält. Andererseits (oder ausserdem) könnte sich aber auch der ATP-Vorrat soweit erschöpfen, dass der Muskel in Starre übergeht. Auch so würde er im erreichten Verkürzungszustand verbleiben.

Umgekehrt könnte beim calciumarmen bzw. calciumverarmten Muskel die bei der Erregung freiwerdende geringere Calciumkonzentration bald nicht mehr ausreichen, den Erschlaffungsfaktor zu hemmen. Die ATP-Spaltung, und damit Zuckung und Kontraktur, würden immer geringer. Der Muskel müsste schliesslich infolge der «Weichmacherwirkung» der ungespalten anwesenden ATP im Erschlaffungszustand verharren. Calciumverarmten Muskelfasern geht also die Aufrechterhaltung des Aktivzustandes des kontraktilen Apparates immer mehr verloren.

Aus unseren zahlreichen Untersuchungen an den verschiedensten Kontrakturen[21] (Erregungs- und Schädigungskontrakturen) ergibt sich immer wieder das gleiche Bild: Ohne eine bestimmte Menge freier Calcium-Ionen vermag ein Muskel keine Kontraktur zu unterhalten bzw. nicht einmal auszulösen (über entsprechende Befunde am Herzmuskel: [22–24]). Das heisst, Calcium-Ionen sind sowohl bei der Aktivierung als auch bei der Erhaltung des Aktivzustandes der Kontraktur beteiligt. Ob alle diese Calciumwirkungen nur über die Beeinflussung (Hemmung) des Erschlaffungsfaktors gehen, ist unbekannt, erscheint uns aber nicht wahrscheinlich, wenn man bedenkt, dass die Fibrillen in der lebenden Muskelfaser in ein kompliziertes biologisches System eingebettet sind (Sarkoplasma, Membran), das für sie nicht nur das chemische, sondern auch das physikalische Milieu abgibt, mit dem sie in enger Wechselbeziehung stehen. Es ist bekannt, dass Calcium-Ionen die Permeabilität der Membran für Na- und K-Ionen in Ruhe und Aktivität beeinflussen (Übersicht bei [18]). Man muss ferner damit rechnen, dass diese zweiwertigen stark hydratisierten Ionen, die eine erhebliche Wirkung auf die Stabilität und Quellung kolloidaler Lösungen haben, auch die Viskosität des Sarkoplasmas verändern (Entquellung). Die Längenänderungen des Fibrillensystems und die damit verbundenen Bewegungen der – wie wir vermuten – als «Bremsscheiben» wirkenden Z-Membransiebe könnten durch Viskositätsänderungen dieser sie umgebenden kolloidalen Lösung modifiziert werden. Es ist auffällig, dass bei aufeinanderfolgenden Tiegelschen Kontrakturen in calciumreichen Muskeln die Anstiegssteilheit immer flacher wird (Fig. 1b und 2b). Auch bei KCl-Kontrakturen konnten wir eine zunehmende Verlängerung der Anstiegszeit beobachten, je höher die Calciumkonzentration war, in der die Muskeln gebadet wurden. Inwieweit dieser Effekt über eine Beeinflussung der Membran, des Sarkoplasmas oder anderer Mechanismen durch Calcium zustandekommt, muss vorerst offenbleiben. Weitere Untersuchungen über Erregung, Kontraktion (Aktivierung, 'active state', Verhalten der elastischen Eigenschaften), Ionenkinetik, Stoffwechsel (oxydativer Stoffwechsel, Umsatz energiereicher Phosphate) bei Kontrakturen phasischer und tonischer Muskeln unter Variation der Calciumkonzentration können erst tiefere Einblicke verschaffen. Es ist aber wahrscheinlich, dass verschiedene Angriffspunkte der Calcium-Ionen in der Muskelfaser existieren.

Summary. 1. The occurence of 'Tiegel's contractures' in phasic and tonic muscles is significantly influenced by the extracellular calcium concentration. 2. Muscles of both types show only small and short aftercontractures after preceding treatment with calciumfree Ringer's solution and become refractory to repeated stimuli while in the relaxed state. 3. Muscles of both types, however, which have been pretreated with calcium-rich Ringer's solution, show strong and long-lasting after-contractures and become refractory to repeated stimuli while in a state of maximal contracture. 4. The possible explanations for this different behaviour are briefly discussed and it is assumed that calcium ions have several sites of action within the muscle cell.

K. Brecht und P. Pauschinger

Physiologisches Institut Tübingen (Deutschland), 19. Dezember 1960.

[20] H. H. Weber, *The Motility of Muscle and Cells* (Harvard University Press, 1958).
[21] Darüber wird an anderer Stelle berichtet.
[22] H. C. Lüttgau und R. Niedergerke, J. Physiol. *143*, 486 (1958).
[23] R. Niedergerke, J. Physiol. *134*, 569, 584 (1956).
[24] R. Niedergerke und H. C. Lüttgau, Nature *179*, 1066 (1957).

PRAEMIA

Fonds für den Ruzicka-Preis

Ausschreibung des Preises für 1961

Aus dem Fonds für den Ruzicka-Preis wird alljährlich einem jungen Forscher für eine hervorragende veröffentlichte Arbeit auf dem Gebiete der allgemeinen Chemie ein Preis erteilt. Die chemischen Arbeiten, welche mit einem Preis ausgezeichnet werden sollen, müssen entweder in der Schweiz oder von Schweizern im Ausland ausgeführt worden sein.

Kandidaten dürfen in dem Jahre, in welchem sie den Preis erhalten, das 45. Lebensjahr nicht überschritten haben. Sie können dem Kuratorium von dritter Seite vorgeschlagen werden oder sich auch selbst um den Preis bewerben.

Die Preiserteilung erfolgt auf Antrag eines Kuratoriums durch den Schweiz. Schulrat. Die Höhe des Preises wird auf Antrag des Kuratoriums in jedem einzelnen Fall durch den Schweiz. Schulrat festgesetzt. Die Überreichung des Preises erfolgt im September 1961.

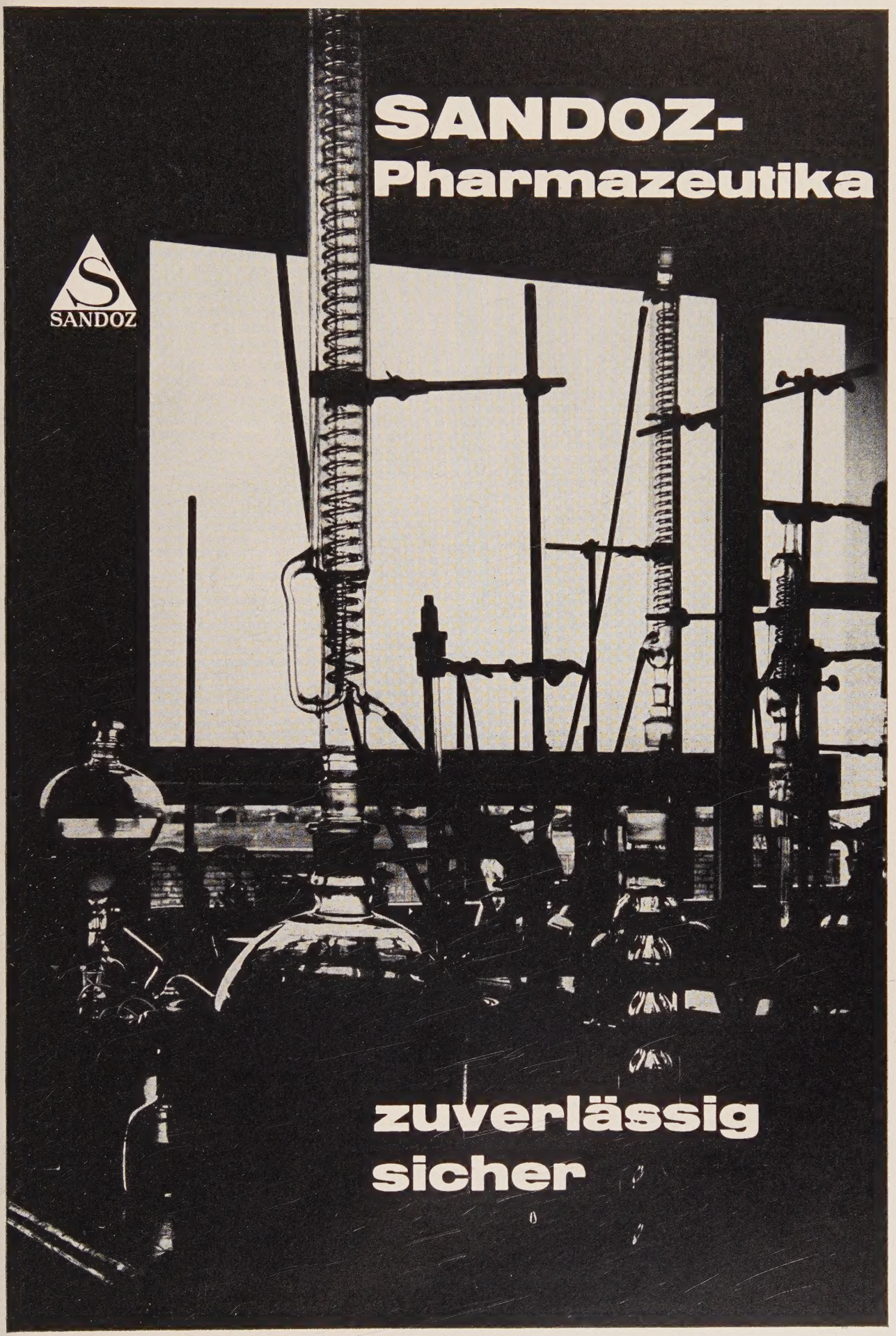
Bewerbungen und Anträge sind unter Angabe der chemischen Arbeit, für welche der Preis erteilt werden soll, *bis spätestens Samstag, den 29. April 1961*, dem Sekretariat des Schweiz. Schulrates, Eidg. Technische Hochschule, Leonhardstrasse 33, Zürich 6, einzureichen.

Der Präsident des Schweiz. Schulrates
Prof. Dr. H. Pallmann

CORRIGENDA

R. A. Edgren and D. W. Calhoun: *Multiple Effects of Oestrone and Testosterone Propionate in Combination: Simultaneous Effects on Vaginal Keratinization and Uterine Growth.* Exper. vol. xvi, fasc. 12, p. 544 (1960). The Table in this paper is unclear. Each value in the Uterine Weight column is significantly greater (1% level) than the one above it. Thus TP stimulated uterine growth as did the oestrone, and the combination oestrone plus TP produced more growth than did either steroid alone.

C. R. Pringle and J. M. Stewart: *Rate of Respiration in Relation to Autogamy in Paramecium aurelia.* Exper. vol. xvii, fasc. 2 (1961). In the Table on p. 74, the heading of column 7 should read: Mean oxygen consumption ($\mu l/h \times 10^{-3}$).


SANDOZ-
Pharmazeutika
SANDOZ
zuverlässig
sicher

Taschenatlas der Schweizer Flora

Mit Berücksichtigung der ausländ. Nachbarschaft

von

EDUARD THOMMEN

Über 3000 Schwarzweißfiguren mit Angabe der Blütenfarbe · Dritte Auflage (1961) · 319 Seiten Biegsam in Ganzleinen Fr. 14.50 (DM 14.50)

Der hiermit zum dritten Male aufgelegte «Taschenatlas der Schweizer Flora» von Eduard Thommen ist allen denen ein wertvolles Hilfsmittel, die sich von Berufs wegen, im Schulbetrieb oder aus Liebhaberei mit der reichen Flora der Schweiz und ihrer Nachbargebiete befassen. Er bildet die illustrative Ergänzung zu den im Gebrauch befindlichen Bestimmungsbüchern, deren Benützung er erheblich erleichtert.
Durch Vereinfachung der Darstellung, die mit bescheidenem Aufwand auskommt und dennoch klar bleibt, ist es dem Verfasser gelungen, auf 250 Bildseiten mehr als 3000 Arten, Unterarten und Varietäten unterzubringen, somit ein Anschauungsmaterial, wie es in dieser Vollständigkeit auf so knappem Raum noch nirgends zusammengetragen worden ist. Angaben über die Blütenfarbe machen es dem Benützer leicht, die Schwarzweißfiguren selber zu kolorieren.

Zu beziehen durch ihre Buchhandlung

BIRKHÄUSER VERLAG
BASEL UND STUTTGART

Atlas de poche de la flore suisse

Comprenant les régions étrangères limitrophes

par

EDOUARD THOMMEN

Plus de 3000 dessins au trait avec indication de la couleur des fleurs · Deuxième édition (1961) 319 pages · Relié en toile F. 14.50 (DM 14.50)

Cet «Atlas de poche de la flore suisse» par Edouard Thommen a été conçu pour tous ceux qui désirent se familiariser avec les plantes de chez nous mais qui ne disposent pas des grandes et coûteuses Iconographies et éprouvent des difficultés à consulter fructueusement les flores analytiques ordinaires. Il sera notamment très utile aux possesseurs de l'ouvrage «Flore de la Suisse» par A. Binz et E. Thommen, deuxième édition, parue en 1953. Il correspond à ce volume tant extérieurement que par son contenu et son ordonnance, ce qui permet l'utilisation parallèle des deux ouvrages.
Plus de 3000 espèces, sous-espèces et variétés sont dessinées au trait dans les 480 planches de ce volume et des indications succinctes quant aux couleurs permettent au lecteur de colorier les fleurs s'il le désire.

Commandes à votre libraire

BIRKHÄUSER VERLAG
BASEL UND STUTTGART

Demnächst erscheint:

Proceedings of the International Symposium on Polarization Phenomena of Nucleons

Basel, July 4–8, 1960 · Editors: Prof. Dr. P. HUBER and Dr. K. P. MEYER · 436 pp. – Fr./DM 65.– (1961)

HELVETICA PHYSICA ACTA SUPPLEMENTUM VI

I. *Production of Sources and Targets of Polarized Nuclei:*

Authors: W. Paul; R. Fletschmann; G. Clausnitzer; R. Keller, L. Dick et M. Fidecaro; M. K. Craddock; L. Brown, E. Baumgartner, P. Huber, H. Rudin, and H. R. Striebel; V. W. Hughes, C. W. Drake, Jr., D. C. Bonard, J. S. Greensberg and G. F. Pieper; J. Thirion, R. Beurtey et A. Papineau; Ch. F. Hwang and T. M. Sanders, Jr.; I. Alexeff; J. Eisinger; B. Bederson, K. Rubin, and A. Salop; S. P. Heims; J. Heberle; M. Borghini et A. Abragam; N. W. Tanner and J. J. Domingo.

II. *Generation of Polarized Nucleons and Deuterons by Reactions:*

Authors: W. Haeberli; C. C. Jonker; H. Brinkman; H. B. Willard; J. P. Scanlon; B. Hird; Lee G. Pondrom and J. W. Daughtry; S. M. Austin and S. E. Darden; A. Budzanowski, K. Grotowski, H. Niewodniczanski, J. Nurzynski, and M. Slapa; R. Barloutaud, H. Faraggi, A. Garin et L. Rosen; G. Igo; J. E. Brolley, Jr., J. L. Gammel, and L. Rosen.

III. *Reactions and Scattering of Polarized Particles:*

Authors: H. H. Barschall; J. E. Evans; J. Sanada; H. E. Conzett, G. Igo, and A. Nir; Karl W. Brockmann, Jr.; S. E. Darden, C. A. Kelsey, and T. R. Donoghue; H. R. Brugger; D. Brown, A. T. G. Ferguson, and R. E. White; F. L. Hereford; L. Cranberg; G. W. Greenless and A. B. Robbins; M. J. Scott; R. E. White; K. Bearpark, I. Hall, R. E. Segel, S. M. Shafroth, and N. W. Tanner; C. Weddigen and H. Schopper.

IV. *Theories Concerning Polarization Effects of Nucleons:*

Authors: G. Breit; J. L. Gammel; L. C. Biedenharn and G. R. Satchler; L. J. B. Goldfarb; J. L. Gammel, B. J. Hill, and R. M. Thaler; J. L. Gammel and R. M. Thaler; R. J. N. Philips; F. Bjorklund, G. Campbell, and S. Fernbach.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung – Obtainable from your bookseller – Commandes à votre libraire

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL UND STUTTGART

NEUERSCHEINUNG

Vergleichende Physiologie

Band V: Physiologie der Erfolgsorgane

Prof. Dr. W. v. BUDDENBROCK, em. o. ö. Professor für Zoologie an der Universität Mainz (Deutschland)

390 Seiten mit 110 Tabellen, 161 Figuren und 1 Farbtafel
Preis gebunden Fr./DM 54.– (1961)

Sammlung «Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiet der exakten Wissenschaften», Reihe der experiment. Biologie. Band 10

Gekürztes Inhaltsverzeichnis: Allgemeine Muskelphysiologie. Die Muskelphysiologie der einzelnen Tierstämme, Physiologie der Geissel- und Cilienbewegung. Die Protoplasmabewegung. Die Physiologie der Chromatophoren (Farbwechsel). Das tierische Leuchten. Die Produktion der elektrischen Energie.

Bereits erschienen sind:

Band I: Physiologie der Sinnesorgane.
504 S. mit 256 Fig. Leinen Fr./DM 46.– (1952).
Band II: Physiologie des Nervensystems.
396 S. mit 183 Fig. Leinen Fr./DM 39.– (1953).
Band III: Ernährung, Wasserhaushalt, Mineralhaushalt der Tiere. 678 Seiten, 241 Tabellen und 205 Figuren Leinen Fr./DM 68.– (1956).
Band IV: Hormone. 492 Seiten mit 115 Fig. und 106 Tab. Leinen Fr./DM 52.– (1950).
Band VI: Blut, Atmung, Excretion. In Vorbereitung.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung - Obtainable from your bookseller

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL UND STUTTGART

WE NEVER
SAY "NO"

WE SHIP YOUR
ORDER TODAY
(Air Mail or Parcel Post, as you wish)

18,000
CHEMICALS FOR
IMMEDIATE DELIVERY
FROM STOCK.
LARGEST VARIETY
ANYWHERE

Ask for our new catalogue

BIOS *Laboratories, Inc.*
17 West 60th St., New York City 23, U.S.A.
Kabeladresse: BIOSLAB

LE ROY

Statistische Methoden der Populationsgenetik

Ein Grundriss für Genetiker, Agronomen und Biomathematiker

Von Prof. Dr. HENRI LOUIS LE ROY, ausserordentlicher Professor für Biometrik und Populationsgenetik an der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich. 391 Seiten mit 65 Figuren. Preis gebunden Fr. 67.50 (DM 67.50) (1960)

Reihe der experimentellen Biologie, Band 15
Sammlung «Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften»

Aus dem Inhalt: Die Merkmalsprägung – Die Gen- und Umwelteffekte als Korrelationsfaktoren – Die Varianzanalyse als Grundlage für die Schätzung der Gen- und Umweltwirkung – Die künstliche Selektion Literaturverzeichnis (mehrere Hundert Literaturangaben über theoretische und praktische Studien).

Über die rein technische Anleitung hinaus, wie statistische Methoden auf genetische Untersuchungen anzuwenden sind, werden die genetischen Hypothesen aufgezeigt, welche von Fall zu Fall in die verschiedenen statistischen Methoden eingebaut sind. Die klare Formulierung der Hypothese ist die Voraussetzung für die Wahl der richtigen statistischen Analyse. Umgekehrt gilt das Ergebnis einer numerischen Auswertung nur für die Hypothese, von der ausgegangen wurde. Für das Verständnis wird die Kenntnis der grundlegenden statistischen Analysenmethoden vorausgesetzt, wie sie z. B. von LINDER (1959 und 1960) in seinen beiden Lehrbüchern sehr instruktiv dargestellt sind. In bezug auf die Genetik genügt die Kenntnis des Mendelismus.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung – Obtainable from your bookseller – Commandes à votre libraire.

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL UND STUTTGART

Fortschritte der Arzneimittelforschung
Progress in Drug Research
Progrès des recherches pharmaceutiques

Editor: Dr. ERNST JUCKER, Basel

Vol. 2 (1960), 636 pp., sFr. 85.- (DM 85.-)

Mit dem 1959 erschienenen ersten Band wurde eine Monographiereihe gegründet, die fortlaufend über aktuelle Gebiete der Arzneimittelforschung orientiert. Der nun vorliegende zweite Band enthält neun Übersichtsreferate bekannter Forscher, die ihre Themen erschöpfend behandeln und darüber hinaus noch Anregungen für die Bearbeitung und Weiterentwicklung verschiedener Forschungsgebiete vermitteln. Auch dieser Band schliesst eine Lücke in der Fachliteratur der Arzneimittelforschung, indem er einen Platz zwischen den bekannten Periodica und den grossen Handbüchern und Monographien einnimmt.

The first volume, which appeared in 1959, initiated a new and up-to-date series of progressive reviews covering topical subjects in pharmaceuticals research. The present, second volume contains nine reviews by well-known researchers who not only discuss their subjects in detail, but also make suggestions in which direction further work in various research subjects should develop. This volume also fills a gap in the technical literature dealing with pharmaceutical research; its place is between the known periodicals and the comprehensive text books and monographs.

En 1959 a paru le premier volume d'une série de monographies, visant à apporter une information continue sur des domaines d'actualité des recherches pharmaceutiques. Le présent volume 2 se compose de neuf exposés émanant de savants connus, qui traitent leur sujet de manière approfondie et proposent en outre des suggestions pour l'étude ou la poursuite des recherches sur différents thèmes. Ce volume prend place entre les périodiques connus et les manuels et monographies et comble ainsi une lacune de la bibliographie dans le champ de la recherche pharmaceutique.

Inhalt / Contents / Sommaire Vol. 2 (1960)

K. H. BEYER and J. E. BAER, West Point: **Newer Diuretics** – B. CAMERINO and G. SALA, Milano: **Anabolic Steroids** – C. J. CAVALLITO and A. P. GRAY, Decatur: **Chemical Nature and Pharmacological Actions of Quaternary Ammonium Salts** – A. CERLETTI, Basel: **Über Vorkommen und Bedeutung der Indolstruktur in der Medizin und Biologie** – W. KUNZ, Monheim: **Über neue Arzneimittel** – K. NÁDOR, Budapest: **Ganglienblocker** – A. PLETSCHER, K. F. GEY und P. ZELLER, Basel: **Monoaminoxydasehemmer** – W. A. SEXTON, Macclesfield, Cheshire: **The Structure and Biogenesis of Certain Antibiotics** – D. W. WOOLLEY, New York: **Antimetabolites and their Revolution in Pharmacology**

Inhalt / Contents / Sommaire Vol. 1 (1959)

J. B. BÜCHI, Zürich: Ionenaustauscher und ihre Anwendung in der Pharmazie und Medizin. – K. K. CHEN und T.-M. LIN, Indianapolis: Cholesterol and Its Relation to Atherosclerosis. – H. A. OELKERS, Hamburg: Therapie der Wurmkrankheiten. – J. BALLY, Basel: Neue Aspekte der chemischen Anthelminticaforschung. – H. HAAS, H. FINK und G. HÄRTFELDER, Ludwigshafen: Das Placeboproblem. – A. H. BECKETT, London: Stereochemical Factors in Biological Activity. – W. KUNZ, Monheim: Neuere Arzneimittel – eine Übersicht über die letzten fünf Jahre.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung . - Obtainable from your bookseller - Commandes à votre libraire

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL UND STUTTGART